Untersuchungen zur molekularen Struktur des *FAS2* Gens der Hefe

von
Ursula Hoja
aus Pappenheim

Diss. Erlangen
1986 № 213

Untersuchungen zur molekularen Struktur des *FAS2* Gens der Hefe

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Ursula Hoja
aus Pappenheim

Untersuchungen zur molekularen Struktur des *FAS2* Gens der Hefe

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Ursula Hoja
aus Pappenheim

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 8.4.1986

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Brodersen

Erstberichterstatter: Professor Dr. E. Schweizer

Zweitberichterstatter: Professor Dr. H. Kersten

Diese Arbeit wurde selbständig durchgeführt. Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht verwendet.

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1982 bis Oktober 1985 unter Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer am Lehrstuhl für Biochemie des Instituts für Mikrobiologie und Biochemie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Schweizer für die Themenstellung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit.

Für die Mithilfe bei den Hefe-Transformationsexperimenten danke ich Fr. B. Hoffmann ganz herzlich.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538118_0007

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
	Verzeichnis der Tabellen	6
	Verzeichnis der Abbildungen	6
1.	EINLEITUNG	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1.	Geräte	12
2.2.	Chemikalien	13
2.3.	Enzyme	14
2.4.	Puffer und Lösungen	14
2.5.	Medien	15
2.5.1.	Medien zur Bakterien-Kultur	16
2.5.2.	Medien zur Hefe-Kultur	17
2.6.	Plasmid-Vektoren	18
2.7.	Stämme	19
2.7.1.	*E.coli* Stämme	19
2.7.2.	*Saccharomyces cerevisiae* Stämme	19
2.8.	Anzucht von *E.coli*- und Hefe-Zellen	20
2.9.	Zelldichtebestimmungen	20
2.10.	Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen	21
2.11.	Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.11.1.	K-Acetat-Methode	21
2.11.2.	Sucrose-Methode	23
2.11.3.	Miniscreen-Methode	24

2.12. Isolierung von doppelsträngiger M13-Phagen DNA (replikative Form) 24

2.13. Reinigung von Plasmid-DNA 25

2.13.1. Säulenchromatographie zur Abtrennung von RNA 25

2.13.2. CsCl/Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Zentrifugation 26

2.14. Regenerieren von CsCl 27

2.15. Nukleasebehandlungen von DNA 28

2.15.1. Restriktionsendonuklease-Spaltungen 28

2.15.2. DNA-Abbau mit *Bal31*-Exonuklease 28

2.16. DNA-Gelelektrophorese 29

2.16.1. Agarose-Gele für analytische Zwecke 29

2.16.2. Agarose-Gele für präparative Zwecke 30

2.17. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen 30

2.17.1. "freeze-squeeze"-Methode 30

2.17.2. Natriumjodid-Methode 31

2.18. Phosphatase-Behandlung von Vektor-DNA 32

2.19. "Auffüllen" von überstehenden DNA-Enden mittels des DNA-Polymerase "Klenow"-Fragments 33

2.20. Ligation von DNA 34

2.21. Transformation von *E.coli* 35

2.21.1. RbCl-Methode 35

2.21.2. $CaCl_2$-Methode 36

2.22. Transfektion von *E.coli 71-18* bzw. *JM105* 37

2.23. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* 38

2.24. Mitotische Stabilität von *S. cerevisiae* Transformanten 41

3. ERGEBNISSE 42

3.1. Konstruktion der Vektoren pMS 202 und pMS 203 42

3.2. Subklonierung von *FAS2*-Restriktionsfragmenten 50

3.2.1. Klonierung von *EcoRI*-Fragmenten in dem Vektor pMS 202 50

3.2.2. Einbau von *PvuII*-Fragmenten aus pMS 2583 in den Vektor pMS 201 und Bestimmung ihrer Orientierung darin 59

3.2.3. Klonierung von *FAS2*-Restriktionsfragmenten in M13-Vektoren 63

3.3. Konstruktion des Plasmides pMS 3276 und Charakterisierung der daraus hergestellten *Ba131*-Deletionsplasmide 70

3.4. Sukzessive Verkürzung von pMS 3291 mit *Ba131*-Exonuklease 81

3.5. Transformation von biochemisch definierten *fas2*-Mutanten mit subklonierten *FAS2*-DNA Restriktionsfragmenten 86

3.6. Mitotische Stabilität von *FAS2/TRP1* Transformanten 115

3.7. Optimierung der Transformationseigenschaften klonierter *FAS2*-DNA 139

4. DISKUSSION 147

5. ZUSAMMENFASSSUNG 154

Literaturverzeichnis 156

Abkürzungen 161

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Seite

Tab.1: Subklonierte Restriktionsfragmente aus dem Bereich des *FAS2*-Gens 68

Tab.2: Für die Transformation verwendete *fas2/trp1*-Doppelmutanten 90

Tab.3: Transformation von *fas2/trp1*-Doppelmutanten mit klonierten *FAS2*-DNA-Fragmenten 91

Tab.4: Mitotische Stabilität der durch Transformation mit *FAS2*-Subklonen erhaltenen *FAS2/TRP1*-Prototrophen 119

Tab.5: Transformation von *fas2*-Mutanten mit klonierter, potentiell intakter *FAS2*-DNA 145

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abb. 1: Reaktionsschema der Fettsäurebiosynthese 9

Abb. 2: Restriktionskarte des *FAS2*-Plasmids pMS 2583 nach T. Laux 43

Abb. 3: Restriktionskarte des Cosmid-Vektors pMS 201 44

Abb. 4: Partielle *EcoRI*-Verdauung von pMS 201 47

Abb. 5: Konstruktionsschema der beiden Vektoren pMS 202 und pMS 203 aus pMS 201 48

Abb. 6: *EcoRI/SalI*-Doppelverdauung der neukonstruierten Vektoren pMS 202 und pMS 203 49

Abb. 7: *PstI*-Restriktionsmuster der Vektoren pMS 201, pMS 202 und pMS 203 53

Abb. 8: Restriktionsanalyse verschiedener *EcoRI*-Subklone aus pMS 2583 zur Bestimmung der *FAS2*-Fragment Orientierung im Vektor pMS 202 54

Abb. 9: Partielle *EcoRI*-Spaltung von pMS 2583 57

Abb.10: Restriktionsanalyse der *FAS2*-Subklone pMS 3243 und pMS 3244 58

Abb.11: *PvuII*-Restriktionsmuster ausgewählter *FAS2*-Subklone 61

Abb.12: Charakterisierung der Orientierung der *FAS2*-Insertionen im Vektor pMS 201 62

Abb.13: Restriktionsanalyse von *FAS2*-Subklonen nach Umklonierung aus pMS 3249 (a) bzw. pMS 3210 (b) in M13 mp11 bzw. M13 mp18 66

Abb.14: In dieser Arbeit subklonierte *FAS2*-Fragmente und ihre Orientierung im jeweiligen Vektor 67

Abb.15: Partielle *SphI*-Spaltung von pMS 2583 74

Abb.16: Restriktionsanalyse des *FAS2*-Klons pMS 3276 75

Abb.17: Verkürzung von linearisierter pMS 3276-DNA mit *Bal31*-Exonuklease 76

Abb.18: Restriktionsanalyse einiger der durch *Bal31*-Abbau aus pMS 3276 erhaltenen Deletionsplasmide 77

Abb.19: Restriktionskartierung der aus pMS 3276 abgeleiteten *Bal31*-Deletionsplasmide 80

Abb.20: *EcoRI/HindIII*-Restriktionskarte (ohne Vektor) der aus pMS 3291 durch *Bal31*-Verdauung entstandenen Plasmide 84

Abb.21: Restriktionsmuster der durch *Bal31*-Verdauung von pMS 3291 gewonnenen Deletionsplasmide 85

Abb.22: Physikalische Karte und Transformations-Eigenschaften der in dieser Arbeit konstruierten *FAS2*-Subklone 108

Abb.23: Reihenfolge und Ausdehnung der drei katalytischen Domänen im *FAS2*-Gen 110

Abb.24: Zusammenstellung der zur direkten Transformation von *fas2*-Mutanten eingesetzten *FAS2*-Subklone 144

Abb.25: Restriktionskarte der Klone YEpFAS2 (Herkunft S. Wakil) und 102B5 (Herkunft J. Carbon) 153

Die Synthese langkettiger, gesättigter Fettsäuren wird von dem Enzymsystem Fettsäuresynthetase (FAS) katalysiert (1, 2). Ausgehend von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA werden in einem mehrfach wiederholten Reaktions-Zyklus Fettsäuren um jeweils zwei C-Atome zu einer Kettenlänge von letztlich 16-18 Kohlenstoff-Atomen verlängert (vgl. Abb.1).

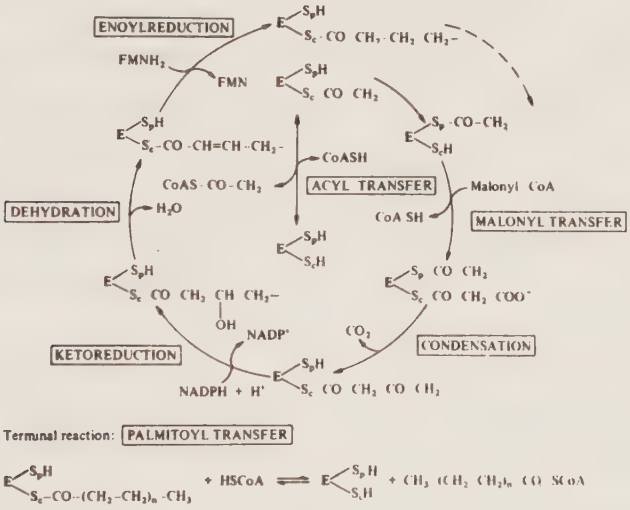


Abb.1: Reaktionsschema der Fettsäurebiosynthese,

nach Lynen (3)

E-S_c: aktives Zentrum des Acyl-Carrier-Proteins ("zentrale SH-Gruppe")
E-S_p: aktives Zentrum der ß-Ketoacylsynthase ("periphere SH-Gruppe")

Obwohl das Reaktionsschema der Fettsäurebiosynthese bei unterschiedlichen Organismen im wesentlichen dasselbe ist, weist die molekulare Struktur der verschiedenen FAS-Enzymsysteme sowie die Anzahl der *FAS*-codierenden Gene in verschiedenen Organismen-Klassen charakteristische Unterschiede auf. In den meisten Prokaryonten (4) und in Chloroplasten (5) setzt sich das Enzymsystem Fettsäuresynthetase aus 7 Einzelenzymen zusammen. Bei Wirbeltieren hingegen besteht die Fettsäuresynthetase aus zwei identischen Protein-Untereinheiten (α_2), von denen jede alle acht an der Fettsäurebiosynthese beteiligten katalytischen Funktionen in einer einzigen multifunktionellen Proteinkette vereinigt enthält (6). Bei Hefen und anderen niederen Pilzen (7) schließlich ist die Fettsäuresynthetase ein Komplex aus zwei proteinchemisch verschiedenen Untereinheiten α und β, die von zwei verschiedenen Genen (*FAS1* für β und *FAS2* für α) kodiert werden. In ihrer aktiven Form hat die Hefe-Fettsäuresynthetase die Struktur $\alpha_6\beta_6$. Wie im Vertebraten-Enzym ist auch in der Hefe-FAS jede Untereinheit multifunktionell, d.h. sie trägt mehrere katalytische Domänen in einer einzigen Polypeptidkette. Durch genetische Studien konnte an der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, daß die Acetyl-Transferase, Malonyl-Transferase, Palmityl-Transferase, Dehydratase und Enoylreduktase (2.Reduktion) Teilaktivitäten in der *FAS1*-kodierten β-Untereinheit und die β-Ketoacylsynthase (Kondensation), die β-Ketoacylreduktase (1.Reduktion) Teilaktivitäten sowie das Acyl-Carrier-Protein in der *FAS2*-kodierten α-Untereinheit lokalisiert sind (8).

In den vergangenen Jahren wurden an diesem Institut die

Fettsäuresynthetase-Gene *FAS1* und *FAS2* aus einer Hefe-Genbank isoliert (9). Anschließend wurde zunächst das *FAS1*-Gen näher untersucht und dabei die Reihenfolge der Teilfunktionen auf dem Gen festgestellt (10). Weiterhin wurde auch die Sequenzierung des *FAS1*-Gens und seiner flankierenden Bereiche inzwischen mit Erfolg abgeschlossen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten entsprechende Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Genstruktur auch an *FAS2* begonnen werden. Auch hier sollte durch Transformation definierter *fas2*-Mutanten mit subklonierten *FAS2*-Teilbereichen die Reihenfolge und Lage der Domänen im Gen ermittelt werden. Zu diesem Zwecke sollte im ersten Teil dieser Arbeit eine Serie von sich teilweise überlappenden *FAS2*-Subklonen hergestellt werden, mit denen dann im zweiten Teil geeignete *fas2*-Hefemutanten transformiert werden konnten. Weiterhin sollten *FAS2*-Plasmide mit - gegenüber dem ursprünglich isolierten *FAS2*-Klon pMS 2583 - deutlich verbesserten Transformationseigenschaften konstruiert werden. Schließlich sollten in dieser Arbeit Voraussetzungen für die Sequenzierung des *FAS2*-Gens geschaffen werden. Hierfür sollten *FAS2*-Fragmente aus Hefe/*E.coli* "shuttle"-Vektoren in M13-Sequenzierungsvektoren umkloniert werden.
Die Versuche zur Bestimmung der *FAS2*-Domänenreihenfolge konnten in dieser Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluß gebracht werden. Für die Sequenzierung des Gens wurden wichtige Vorarbeiten geleistet.

2.1. Geräte

Autoklaven (Webeco Typ A5, Melag Typ 23); Brutschrank (Heräus Christ Typ VI 5050 Ek); Tiefkühlschrank -70°C (Cenco 1130); Kühl- und Tiefkühlschränke -20°C (Privileg, Bosch); Wasserbäder (Julabo Exatherm P5, Braun Thermomix GFL); Eismaschine (Scotsman); Fraktionssammler (7000 Ultrorac, LKB; Gilson); Mikroskop (Zeiss Standard 14); mikroskopische Zählhilfe (Saaringia Thoma, Tiefe 0.001mm, 0.0025mm²); DNA-Gel Photographie (Polaroid-Kamera MP4, Film-Typ 665); UV-Lampen (Desaga Mini UVIS, Vetter RuVeChroma 41); Waagen (Mettler P1000 N, P1200); Mikrowaage (Sartorius 2414); Schüttler (New Brunswick Modell G25 und Modell G10, thermostatisiert); Rolltrommel (New Brunswick TC5); sterile Arbeitsbank, Flowhood (Ceag); Magnetrührer (Ika Combimag); Whirlmix (Cenco); Netzgeräte (Desaga Modell 500/500, EC Apparatus Co., Florida); Trockenschränke 200°C, 80°C (Memmert); Spektralphotometer (Gilford Modell 250); Durchflußphotometer (Isco Absorbance/Fluorescence Monitor UA5 mit eingebautem Schreiber und optischer Einheit Typ 6); Kolorimeter zur Zelldichtebestimmung (Klett-Summerson Typ 800-3 mit Blaufilter Nr.42 und Grünfilter Nr.54, MFG Co. Inc., New York); Automatik-Pipetten (Gilson Pipetman P20, P200, P1000); Ultrazentrifuge (Beckman L5-65); Kühlzentrifugen (Sorvall Superspeed RC5, Beckman J-21B); Rotoren Ti-60, Ti-50, JA-20, JA-14 (Beckman), GSA und SS 34 (Sorvall); Tischzentrifuge (Heräus Christ Labofuge II); Eppendorf-Zentrifuge (Eppendorf

Centrifuge 5412); Vakuum Konzentrator (Bachofer Speed Vac Concentrator); pH-Meter (Knick Typ 511).

2.2. Chemikalien

Agar-Agar, Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Pepton, Hefe-Extrakt, Nutrient-Broth, Yeast Nitrogen Base (Difco, Detroit);

Antibiotic Medium Nr.3 (Oxoid, Wesel);

CsCl (Ega, Steinheim);

Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol, Dodecylsulfat Na-Salz, Polyäthylenglykol 4000 und 6000, Dithiothreitol, Bromphenolblau, Sucrose p.A., Tween 40 (Serva, Heidelberg);

Trizma Base (Trishydroxymethyl-aminomethan), Agarose low EEO, MOPS (3-N-Morpholino-propansulfonsäure), IPTG (Isopropyl-thiogalactopyranosid), dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Rinderserumalbumin, EGTA (Äthylen glykol-bis-2-aminoäthyl-tetra-acetat), Mg-Acetat (Sigma, München);

ATP, Ammoniumsulfat, Borsäure, Phenol, NaCl, Isopropanol, Adenin, Phenylalanin, Paraffin dünnflüssig (Fluka, Neu-Ulm);

Na-Acetat, $CaCl_2$, RbCl, $MgCl_2$, Diäthyl-Äther, DMSO (Dimethylsulfoxid), EDTA (Titriplex III), Ethidiumbromid, Glukose, K-Acetat, KH_2PO_4, K_2HPO_4, NaOH-Plätzchen,

Thiamin-HCl, Sorbit, Na_3-Citrat, Mercaptoethanol, L-Arginin, L-Histidin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Threonin, L-Tryptophan (Merck, Darmstadt);

Ficoll, Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala);

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylgalactopyranosid) (BRL, Neu-Isenburg).

2.3. Enzyme

Zymolyase 60000 aus *Arthrobacter luteus* (Seikagaku Kogyo Co. Ltd., Tokio);

Lysozym 2200 U/mg (Serva, Heidelberg);

Restriktionsendonukleasen: *BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, PvuII, SmaI, SphI, XbaI, XhoI* (Boehringer, Mannheim);

Bal31, T4 DNA-Ligase (BRL, Neu-Isenburg);

DNA-Polymerase "Klenow"-Fragment (Amersham);

alkalische Phosphatase aus Kalbsthymus, Ribonuklease T1 aus *Aspergillus oryzae* 100000 U/ml (Boehringer, Mannheim);

Ribonuklease A aus Rinderpankreas 50000 - 75000 U/mg (Sigma, München).

2.4. Puffer und Lösungen

TE-Puffer: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0

50/10-TE-Puffer: 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0

Sepharose-Puffer: 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0

TAM-Puffer (10x): 0.66M K-Acetat, 0.33M Tris, 0.1M Mg-Acetat, 5mM Dithiothreitol, 100mg/ml BSA, pH 7.9 (11)

Core-Puffer (10x): 500mM Tris, 500mM NaCl, 100mM $MgCl_2$, pH 8.0 (12)

Klenow-Puffer (10x): 0.1M Tris-HCl, 0.1M $MgCl_2$, pH 8.0

TA-Puffer (40x): 1.6M Tris-Acetat, 0.8M Na-Acetat, 0.8M EDTA, pH 7.9

TBE-Puffer (10x): 0.89M Tris, 0.89M Borsäure, 25mM EDTA, pH 8.3 (13)

Ligationspuffer (10x): 0.5M Tris-HCl, 0.1M $MgCl_2$, pH 7.8

Ba131-Puffer (5x): 3M NaCl, 60mM $CaCl_2$, 60mM $MgCl_2$, 0.1M Tris, 5mM EDTA, pH 8.0

Sma-Puffer (10x): 150mM Tris-HCl, 60mM $MgCl_2$, 150mM KCl, pH 8.0

MOPS-Puffer I: 10mM MOPS, pH 7.0, 10mM RbCl (13)

MOPS-Puffer II: 100mM MOPS, pH 6.5, 50mM $CaCl_2$, 10mM RbCl (13)

SCE-Puffer: 1M Sorbit, 0.1M Na_3-Citrat, 10mM EDTA, pH 5.8

SED: 1M Sorbit, 25mM EDTA

PEG-Puffer: 10mM $CaCl_2$, 10mM Tris, pH 7.4

CaS: 1M Sorbit, 10mM $CaCl_2$

2.5. Medien

Die bei den verschiedenen Medien gemachten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Endvolumen von 1l; die Substanzen wurden in deionisiertem Wasser gelöst.
Alle Medien wurden 40 min bei 121°C autoklaviert.
Antibiotika wurden bei Festmedien nach Abkühlen auf 50°C, sonst vor Gebrauch des Mediums zu einer Endkonzentration von 20 mg/l zugesetzt.

2.5.1. Medien zur Bakterien-Kultur

Luria-Broth (LB): 10g Bacto-Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl, pH 7.5; bei Festmedien zusätzlich 2% Agar.

Z-Broth (ZB): 16g Nutrient-Broth, 10g Bacto-Pepton, 2g Glukose, pH 7.5

Penassay-Festmedium (PA): 17.5g Antibiotic-Medium Nr.3, 20g Bacto-Agar

Glukose/Minimal-Festmedium (MB_1): 10.5g K_2HPO_4, 4.5g KH_2PO_4, 1g $(NH_4)_2SO_4$, 0.5g Na_3-Citrat, 0.2g $MgSO_4$, 2g Glukose, 5ug Thiamin-HCl, 15g Agar

Nähr-Agar: 6g Nutrient-Broth, 8g NaCl, 6g Bacto-Agar

2xTY: 16g Bacto-Trypton, 10g Hefe-Extrakt, 5g NaCl

1xTY: 8g Bacto-Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 5g NaCl

H-Platten: 10g Bacto-Trypton, 8g NaCl, 12g Agar

H-Top-Agar: 10g Bacto-Trypton, 8g NaCl, 8g Bacto-Agar

Das Standard-Kulturmedium für *E.coli* war LB.

Antibiotika-Platten wurden aus Penassay-Medium hergestellt.

Glukose/Minimal-Medium, TY- und H-Medien dienten zur Anzucht des F'-Plasmidhaltigen *E.coli*-Stammes *71-18* bzw. *JM105*.

2.5.2. Medien zur Hefe-Kultur

YEP-Medium: 20g Saccharose, 5g Hefe-Extrakt, 6.7g Pepton, bei Festmedien zusätzlich 5g K_2HPO_4, 5g KH_2PO_4, 20g Agar.

YEP/FS-Medium: 20g Saccharose, 5g Hefeextrakt, 6.7g Pepton, 0.3g Butterhydrolysat, 10g Tween 40, bei Festmedien zusätzlich 5g K_2HPO_4, 5g KH_2PO_4, 20g Agar.

-T/FS-Medium zur Selektion von *TRP*-Prototrophen: 6.7g Yeast Nitrogen Base, 20g Saccharose, 0.3g Butterhydrolysat, 10g Tween 40, 25ml Aminosäuremix ohne Tryptophan, 20g Agar.

SOS (20ml): 10ml 2M Sorbit, 6.7ml YEP/FS-Flüssigmedium, 1.3ml 0.1M $CaCl_2$, 2ml H_2O, 27µl einer 1% Tryptophan-Lösung, sterilfiltrieren. Zur Selektion von *FAS*-prototrophen Hefetransformanten wurden statt YEP/FS-Medium nur YEP-Medium und statt 1% Tryptophan-Lösung 27µl YEP/FS-Flüssigmedium zugegeben.

Top-Agar zur Regeneration von *fas*- bzw. *trp*-Auxotrophen (100ml): 18.2g Sorbit, 0.67g Yeast Nitrogen Base, 2g Glukose, 2ml YEP/FS-Flüssigmedium, 0.03g Butterhydrolysat, 1.5g Tween 40, 2.5g Bacto-Agar. Für die Regeneration von *trp*-Auxotrophen wurden zusätzlich 2.5ml Aminosäuremix mit Tryptophan zugesetzt.

Top-Agar zur Selektion von *FAS*- bzw. *TRP*-Prototrophen (100ml): 18.2g Sorbit, 0.67g Yeast Nitrogen Base, 2g Glukose, 2% YEP-Flüssigmedium, 2.5g Bacto-Agar. Für die Selektion von *TRP*-Prototrophen wurden statt 2% YEP 0.03g Butterhydrolysat und 1.5g Tween 40 verwendet, sowie 2.5ml Aminosäuremix ohne Tryptophan zugesetzt.

Aminosäuremix ohne Tryptophan (500ml): 1g Arginin, 0.5g Histidin, 3g Isoleucin, 3g Leucin, 2g Lysin, 0.5g Methionin, 3g Phenylalanin, 2.5g Threonin, 0.5g Adenin.

Aminosäuremix mit Tryptophan (500ml): 1g Arginin, 0.5g Histidin, 3g Isoleucin, 3g Leucin, 2g Lysin, 0.5g Methionin, 3g Phenylalanin, 2.5g Threonin, 0.5g Adenin, 2g Tryptophan.

Als Unteragar bei der Regeneration von *fas*-Auxotrophen diente YEP-Agar, der 1M an Sorbit war (182g/l). Für die Regeneration von *trp*-Auxotrophen wurde als Unteragar -T/FS-Medium verwendet, das Sorbit in einer Endkonzentration von 1M enthielt.

2.6. Plasmid-Vektoren

In dieser Arbeit wurden die Vektoren pMS 201, M13 mp11 und M13 mp18 verwendet.

Der Cosmid-Vektor pMS 201 (vgl. Abb.3) wurde von M. Schweizer aus pHC 79 und pLC 544 konstruiert (9).

Die Vektoren M13 mp11 (14) und M13 mp18 (15) leiten sich von dem einzelsträngigen *E.coli* Phagen M13 ab und besitzen einen Teil des *E.coli* Lac-Operons, in dem eine sog. "Polylinker"-Region mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen inseriert ist.

2.7. Stämme

2.7.1. *E.coli* Stämme

Als Wirtsstamm für M13-Klone diente *E.coli 71-18* (F', *lacI^{q}Z* delta *M15*, delta *lac pro*) (16) bzw. *E.coli JM105* (F', *traD36*, *lacI^{q}Z* delta *M15*, delta *lac pro*, *thi*, *strA*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, *proAB*) (15). Zur Klonierung von *FAS*-DNA-Fragmenten diente der *E.coli* Stamm *RR1* (F$^-$ *hsdS20 recA$^-$ ara14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mtl1 supE44* lambda$^-$ (17) oder *E.coli HB101* (F$^-$ *recA13*, *hsdS20 ara14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl5 mtl1 supE44* lambda$^-$ (18).

Alle *E.coli*-Stämme wurden in Fläschchen mit je 4ml Nähr-Agar (s.o.) bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.7.2. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Fettsäuresynthetase-defekten Hefemutanten (*fas2*-Mutanten) stammen aus der in diesem Institut vorhandenen Sammlung (19) und wurden von E. Höllerer und B. Hoffmann in *fas2/trp1*-Doppelmutanten umgewandelt. Sie wurden in Fläschchen mit 4ml YEP/FS-Agar bei 4°C aufbewahrt.

2.8. Anzucht von *E.coli*- und Hefe-Zellen

E.coli-Zellen wurden auf Festmedium im Brutschrank bei 36°C angezüchtet. Flüssigkulturen wuchsen bei 36°C in Reagenzgläsern (2.5ml) auf einer Rolltrommel bzw. in Erlenmeyer- oder Fernbach-Kolben auf einer geeigneten Schüttelplattform. Hefezellen wurden auf Festmedium bei 30°C im Brutschrank angezogen. Für Transformationsversuche wurden 5ml YEP/FS-Flüssigmedium mit dem von einer Einzelzelle abgeleiteten Zellausstrich angeimpft und mindestens 24h bei 30°C gerollt. Mit dieser Vorkultur wurden 100ml Hauptkultur in Schnabel- oder Erlenmeyer-Kolben beimpft. Diese wurden ca. 20h bei 30°C unter Schütteln angezogen.

2.9. Zelldichtebestimmungen

Die Zelldichte von *E.coli* Kulturen wurde kolorimetrisch (Klett-Summerson Kolorimeter, Grünfilter) bestimmt, wobei 1 Kletteinheit (1 KE) einer Zelldichte von 2.5×10^6 Zellen/ml entspricht (13).

Die kolorimetrische Zelldichtebestimmung von Hefe-Kulturen erfolgte mit dem Blaufilter, wobei von uns 1 KE zu 1×10^8 Zellen/ml bestimmt wurde.

Zur genaueren Zelldichtebestimmung bei Hefetransformationsversuchen wurden Proben entnommen und unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt.

2.10. Konzentrationsbestimmung von DNA-Präparationen

Die Konzentration von - möglichst RNA-freien - DNA-Lösungen wurde nach geeigneter Verdünnung spektralphotometrisch anhand der Absorption bei 260nm bestimmt. Dabei gilt im Rahmen der hier erforderlichen Genauigkeit:

$$\text{DNA-Konzentration} = A_{260} \times 50\ (\mu g/ml)$$

Als Kriterium für die Verunreinigung von DNA-Lösungen mit Proteinen wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260nm und 280nm bestimmt. Dieses sollte einen Wert zwischen 1.8 und 2.0 einnehmen (20).

2.11. Isolierung von Plasmid-DNA

2.11.1. K-Acetat-Methode (21)

Mit einer Einzelkolonie frisch ausgestrichener *E.coli*-Zellen wurde eine 3-5ml Vorkultur - LB mit entsprechendem Antibiotikum - angelegt und ca. 12-16h bei 36°C wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurde dann 1l Antibiotikum-haltiges LB-Medium angeimpft und bei 36°C bis zu einer Zelldichte von 150-200 KE geschüttelt. Zur Amplifizierung der Plasmid-Kopienzahl (22) wurden 1.2ml einer 10%-igen Chloramphenicol-Lösung in Äthanol zugegeben und weitere 12-16h bei 36°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen in sterilen Zentrifugenbechern geerntet (JA-14, 8000 Upm, 4°C, 5 min) und in 7ml 50/10-TE-Puffer resuspendiert. Unter Kühlung wurden 15ml 0.2M NaOH/1% SDS zugegeben und nach Umschwenken 5 min auf Eis inkubiert, wobei die Zellen lysiert

wurden. Die Proteine wurden durch Zusatz von 7ml 3M K-Acetat, pH 4.8 und nochmaliger 5 minütiger Inkubation auf Eis ausgefällt. Das Lysat wurde anschließend abzentrifugiert (JA-14, 12000 Upm, 4°C, 25 min), der Überstand vorsichtig in JA-20-Nylonzentrifugenbecher abgegossen und die darin enthaltene Plasmid-DNA und RNA durch Zugabe von 0.6-1 Vol. -20°C kaltem Isopropanol gefällt (-70°C, mindestens 1h). Nach Zentrifugation (JA-20, 15000 Upm, 4°C, 20 min) wurde der Überstand sofort abgekippt, der Niederschlag im Vakuum (Speed Vac Concentrator) getrocknet und in 5ml 50/10-TE-Puffer gelöst. Zu dieser Suspension wurden 30µl RNAse A (10mg/ml in 50mM Na-Acetat, pH 4.8; vorher zur Eliminierung der DNAse-Aktivität 10 min gekocht und sofort in Eiswasser abgeschreckt) sowie 1µl T1-RNAse (100U/ul) zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit 1 Vol. (5ml) TE-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt und zur Phasentrennung 5 min bei 12000 Upm (JA-20, 15°C) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben, 0.3M an Na-Acetat, pH 5.1 gemacht, wiederum mit 0.6-1 Vol. kaltem Isopropanol versetzt und mindestens 1h bei -70°C eingefroren. Die so gefällten Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (JA-20, 15000 Upm, 4°C, 20 min), der Niederschlag im Vakuum getrocknet und schließlich in 1.5ml TE-Puffer gelöst. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Lösen bei 4°C aufbewahrt.

Mit der hier geschilderten Methode wurden aus 1l Zellkultur 1-2mg Plasmid-DNA erhalten.

2.11.2. Sucrose-Methode (23)

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie in 2.11.1., es wurde jedoch bei einer Zelldichte von 100-120 KE amplifiziert. Nach der Ernte (s.o.) wurden die Zentrifugenbecher mit den erhaltenen Zellen 1h bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden in 20ml 25% Sucrose in 50mM Tris-HCl, pH 8 resuspendiert und je 10ml dieser Suspension in hoch zentrifugierbare Polycarbonat-Röhrchen (für 60Ti-Rotor) gegeben. Nach Zugabe von je 2ml Lysozym-Lösung (5mg/ml in 250mM Tris-HCl, pH 8) mit anschließender 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden je 4ml 0.2M EDTA, pH 8 zugegeben und nochmals 5 min auf Eis inkubiert, bevor jeweils 0.8ml einer 20%-igen SDS-Lösung vorsichtig zugesetzt wurde. Nachdem je 4ml 5M NaCl (Endkonzentration 1M) zugefügt waren, konnte das Lysat - nach einstündiger Inkubation auf Eis - in einem vorgekühlten Rotor (60Ti) abzentrifugiert werden (1h, 30000 Upm, 4°C). Danach wurde der leicht opaleszierende Überstand vorsichtig abgegossen, mit 20-40ml H_2O/l Bakterienkultur verdünnt und nach Zugabe von 0.2ml RNAse A (s.o.) 30 min bei RT inkubiert. Die Proteine wurden zweimal mit 0.5 Vol. TE-gesättigtem Phenol/0.5 Vol. "Sevac" (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1) und einmal mit 1 Vol. "Sevac" extrahiert, wobei zur Phasentrennung jeweils zentrifugiert werden mußte (s.o.). Die weitere Behandlung verlief dann wie unter 2.11.1.
Nach dieser Methode wurde vor allem bei der Isolierung von sehr großen Plasmiden gearbeitet, da hierbei saubere Präparationen, d.h. weniger chromosomaler Hintergrund, als nach der K-Acetat-Methode erhalten wurden.

2.11.3. Miniscreen-Methode (21)

2ml LB mit Antibiotikum-Zusatz wurden mit einem *E.coli*-Klon beimpft und 10-14h bei 36°C auf einer Rolltrommel inkubiert. 1.5ml dieser Übernachtkultur wurden in einem Eppendorf-Reagiergefäß geerntet (10 sec, Eppendorf-Zentrifuge) und in 100µl 50/10-TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl 0.2M NaOH/1% SDS und 150µl 3M K-Acetat, pH 4.8 wurde jeweils kurz gemischt und 5 min abzentrifugiert. 360µl des erhaltenen Überstandes wurden von den ausgefällten Proteinen und der chromosomalen DNA vorsichtig abgehoben und nach Zugabe von 2.5 Vol. -20°C kaltem Äthanol (96%) mit anschließendem kurzen Mischen wurde erneut 10 min zentrifugiert. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden mit -20°C kaltem Äthanol (66%) nachgewaschen, nochmals 10 min zentrifugiert und, nach Trocknen im Vakuum, in 50µl TE-Puffer gelöst. Aus diesem Ansatz wurden 20-30µg Plasmid-DNA erhalten.

2.12. Isolierung von doppelsträngiger M13-Phagen DNA (replikative Form) (24)

0.5l 1xTY wurden mit 1ml einer Übernacht-Vorkultur von *E.coli 71-18* bzw. *JM105* beimpft und 3h bei 36°C geschüttelt. Dann wurden 1-1.5ml des bei der Miniscreen-Methode angefallenen Phagen-Überstandes zugegeben und weitere 5-6h bei 36°C geschüttelt. Das Ernten der Zellen und die Isolierung der "RF-DNA" des M13-Phagen erfolgte nach der oben beschriebenen

K-Acetat-Methode (s.2.11.1.). Ein Teil des beim Ernten anfallenden Phagen-haltigen Überstandes wurde allerdings für die Isolierung von Einzelstrang-DNA ("SS-Form") aufbewahrt.

Für kleine Präparationen wurde wie folgt verfahren:

1.5ml einer 1:100 verdünnten Vorkultur von *E.coli 71-18* in 2xTY wurden mit einem Plaque der Transformantenplatten per Holzpicker beimpft (weiße Plaques: Vektoren + Insert; blaue Plaques: Vektoren) und 12h in der Rolltrommel bei 36°C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden in Eppendorf-Gefäßen geerntet (10 sec) und der in entsprechende Gefäße dekantierte Phagen-Überstand zunächst bei 4°C aufbewahrt. Aus dem Zellniederschlag wurde die doppelsträngige Phagen-DNA dann nach der oben beschriebenen Miniscreen-Methode (2.11.3.) isoliert.

2.13. Reinigung von Plasmid-DNA

2.13.1. Säulenchromatographie zur Abtrennung von RNA

Zur Reinigung der Plasmid-DNA von stets vorhandener RNA diente die Gelfiltration, die nach dem "Molekularsieb-Prinzip" erfolgt. Zu diesem Zweck wurde eine Säule (Länge: 40-50cm, Radius: 1cm) mit Sepharose 4B gefüllt, die vorher in Sepharose-Puffer (vgl. 2.4.) äquilibriert und anschließend mit der Wasserstrahlpumpe entgast worden war. Aufgetragen wurden 1-2mg Plasmid-DNA in einem Volumen von 1-2ml. Eluiert wurde ebenfalls mit dem Sepharose-Puffer. Das Eluat wurde entweder kontinuierlich in einem UV-Photometer mit Durchflußküvette bei 254nm gemessen (Isco UA-5 mit Schreiber) und

bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 0.25ml/min in Fraktionen zu je 5ml aufgefangen; oder aber die einzelnen Fraktionen wurden per Hand im Photometer bei 260nm gemessen. In jedem Fall wurden die vollständig innerhalb des ersten Gipfels gelegenen Fraktionen vereinigt und mit 1 Vol. -20°C kaltem Isopropanol mindestens 2h bei -70°C gefällt. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend abzentrifugiert (JA-20, 16000 Upm, 4°C, 20 min) und - nach dem Trocknen unter Vakuum (Speed Vac Concentrator) - in 1ml TE-Puffer gelöst.

2.13.2. CsCl/Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Zentrifugation (25)

Für besonders saubere DNA-Präparationen war dieser zusätzliche Reinigungsschritt notwendig, um die verdrillte ("supercoiled") Plasmid-DNA von der linearisierten oder offenen Form, aber auch von eventuell noch vorhandener chromosomaler *E.coli*-DNA zu trennen. Dazu wurden pro Gradient 0.5mg der in 2.12.1. erhaltenen Plasmid-DNA in 7.43ml TE-Puffer aufgenommen, darin 7.56g CsCl gelöst und 0.25ml Ethidiumbromid zugegeben. Damit wurde ein 50Ti-Röhrchen (Polyallomer) gefüllt, mit dünnflüssigem Paraffin überschichtet und bei 42000 Upm (50Ti-Rotor) und 20°C 48h zentrifugiert. Die getrennten DNA-Banden im Gradienten wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die unterste Bande ("supercoiled" Plasmid-DNA) wurde mit einer 1ml Spritze (Kanüle Nr.1) abgezogen. Das Ethidiumbromid wurde durch dreimaliges Ausschütteln mit je 1 Vol. CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt und die wässrige Phase

über Nacht im Kühlraum gegen 2x3l TE-Puffer dialysiert. Die 1cm breiten Dialysierschläuche waren vorher sterilisiert worden (26). Die DNA-Lösung wurde 0.3M an Na-Acetat gemacht und mit 1 Vol. -20°C kaltem Isopropanol gefällt (-70°C, mindestens 2h). Nach Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge, 10 min) wurde der kaum sichtbare Niederschlag einmal mit 66%-igem Äthanol (-20°C) nachgewaschen und nach dem Trocknen in 0.03-0.05ml TE gelöst.

2.14. Regenerieren von CsCl

Das nach dem "Abziehen" der "supercoiled" Plasmid-DNA verbliebene Gemisch aus CsCl, Ethidiumbromid und Nukleinsäuren, bedeckt von einer dünnen Schicht Paraffin wurde gesammelt und daraus das CsCl regeneriert. Dazu wurde nach dem Abheben der Paraffinschicht die Lösung so lange mit technischem Isopropanol ausgeschüttelt (Scheidetrichter), bis sie ganz frei von Ethidiumbromid war. Anschließend wurde die Lösung im Rotationsverdampfer eingeengt. Das auskristallisierte CsCl wurde im 200°C Schrank vollständig getrocknet und portionsweise in kleinen Eisentiegeln mit Gebläse-Brenner von oben und Bunsen-Brenner von unten geschmolzen. Die in bidest. H_2O gelöste Schmelze wurde 10 min mit 3-4 Teelöffeln Aktivkohle gekocht, mit einem Papierfilter vorfiltriert und dann durch einen Membranfilter gesaugt. Die so erhaltene, klare Lösung wurde wieder bis zur Zähflüssigkeit einrotiert, das schon ausgefallene CsCl "abgenutscht" und die Mutterlauge nochmals einrotiert. Schließlich wurde das CsCl bei 80°C getrocknet und

die Absorption einer davon bereiteten 50%-igen Lösung gegen Wasser bei 260nm bestimmt. Dabei sollte der Wert kleiner als 0.02 OD sein (27).

2.15. Nukleasebehandlungen von DNA

2.15.1. Restriktionsendonuklease-Spaltungen

Plasmid-DNAs (0.3-1.5µg/µl) wurden mit 0.2-1U des jeweiligen Restriktionsenzyms pro µg DNA entweder in TAM- oder in Core-Puffer (siehe 2.4.) bei 37°C für mindestens 1h inkubiert. Danach wurden die Enzyme durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C denaturiert. Diese Hitzebehandlung sollte auch die vollständige Trennung noch zusammenhängender bzw. reassoziierter cohäsiver Enden ("sticky ends") bewirken (28).

2.15.2. DNA-Abbau mit *Bal31*-Exonuklease (25)

50-100µg der zu verkürzenden DNA, die unbedingt RNA-frei, d.h. über eine Sepharose 4B-Säule gereinigt sein mußte (vgl. 2.13.1.), wurden mit 0.2U/µg einer Restriktionsendonuklease in einem 80-100µl Ansatz unter den oben beschriebenen Bedingungen linearisiert und die Verdauung nach 2-4h durch Erhitzen auf 65°C gestoppt. Anschließend wurde die linearisierte DNA in *Bal*-Puffer gebracht (Reaktionsvolumen 300µl) und nach Zugabe von 1.2U *Bal31* sofort bei 37°C inkubiert. In 1-3 Minuten-Abständen wurden dem Ansatz

nun 40µl Proben entnommen, die sofort zum Abstoppen der *Bal31*-Aktivität mit je 4µl 0.2M EGTA-Lösung versetzt und anschließend 10 min auf 65°C erhitzt wurden. Damit die hohe Salzkonzentration des *Bal*-Puffers sich nicht störend auf die weitere Versuchsfortführung auswirken konnte, wurde die DNA der einzelnen Proben über Nacht mit 2.5 Vol. -20°C kaltem Äthanol bei -70°C gefällt. Der jeweilige DNA-Niederschlag wurde nach dem Abzentrifugieren einmal mit 66%-igem Äthanol (-20°C) nachgewaschen und nach dem Trocknen in 10µl TE-Puffer aufgenommen. Die so erhaltene salzfreie DNA konnte nun zur Ligation eingesetzt werden.

2.16. DNA-Gelelektrophorese

2.16.1. Agarose-Gele für analytische Zwecke

Gespaltene oder ungespaltene Plasmid- bzw. Phagen-DNAs wurden horizontal in Gelen von 22.5cm x 15.5cm (13-32 Taschen) oder in Mini-Gelen von 7.5cm x 7.5cm (14-15 Taschen) elektrophoresiert. Die Proben waren dabei vor dem Auftragen mit 1/10 Vol. eines Ficoll/Farbstoff-Gemisches (30% Ficoll in TBE, 0.3% Bromphenolblau, 0.5M EDTA) versetzt worden. Die Spannung lag bei 50-200 Volt, je nach Agarose-Konzentration, DNA, Gel und Elektrophorese-Puffer. Die Gele bestanden aus 0.7 - 1.2%-iger Agarose in 1xTBE oder 1xTA (13) und wurden in dem entsprechenden Puffer - 1xTBE bzw. 1xTA - laufen gelassen. Nach dem "Lauf" wurden die DNA-Banden in 0.1%-iger Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und anschließend unter

UV-Beleuchtung photographiert.

2.16.2. Agarose-Gele für präparative Zwecke

Dazu wurden Gele des Formats 23cm x 2cm x 0.5cm aus 0.6 - 1.2%-iger Agarose in 1xTA gegossen, die nur eine einzige Tasche mit 60-120µl Fassungsvermögen hatten. Die Proben wurden wieder mit 1/10 Vol. des Ficoll/Farbstoff-Gemisches (s.o.) versetzt und je nach DNA-Fragmentgröße und Agarose-Konzentration bei 50-100 V elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande das letzte Drittel der Gelstrecke erreicht hatte. Nach 10-20 minütiger Färbung in 0.1% Ethidiumbromid-Lösung wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und weiterverarbeitet (s.u.).

2.17. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Restriktionsgespaltene DNAs wurden, wie in 2.16.2. beschrieben, präparativ elektrophoresiert und die gewünschten Fragmente nach einer der folgenden Methoden isoliert:

2.17.1. "freeze-squeeze"-Methode (29)

Die gespaltenen DNAs wurden in Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden nach Etbr-Färbung mit einer abgeflammten Rasierklinge sorgfältig ausgeschnitten und die Agarosestückchen in kleine Eppendorf-Gefäße (0.5ml) überführt, die zuvor am Boden mit

einer Nadel perforiert worden waren und etwas Glaswolle enthielten. Die Gefäße mit den Agarosestückchen wurden mindestens 5h bei -70°C eingefroren. Anschließend wurden diese kleinen Eppendorf-Gefäße in 1.5ml Reagiergefäße gesteckt und sofort bei Raumtemperatur 10 min zentrifugiert. Dabei trat die Flüssigkeit der Agarose zusammen mit der DNA vom kleinen Gefäß durch die Poren ins größere Gefäß über, wobei die Agarose von der Glaswolle zurückgehalten wurde. Die eluierte DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Vol. 3M Na-Acetat, pH 5.1 mit 2.5 Vol. Äthanol (-20°C) bei -70°C mindestens 5h gefällt. Die gefällte DNA wurde - wie üblich - 10 min abzentrifugiert, einmal mit 66%-igem Äthanol (-20°C) gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 20µl TE-Puffer aufgenommen.

2.17.2. Natriumjodid-Methode (30)

Bei dieser Methode wurde restriktionsgespaltene DNA in TA-Agarose-Gelen (s.o.) elektrophoretisch aufgetrennt, die Banden exakt ausgeschnitten (vgl. 2.17.1.), die DNA-haltigen Agarosestückchen gewogen und in sterile Eppendorf-Reagiergefäße gegeben. Dann wurden 2ml/g Agarose einer gesättigten NaJ-Lösung (454g NaJ in 225ml H_2O mit 2g Na_2SO_3) zugegeben und bis zum vollständigen Auflösen der Agarose ca. 30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Danach wurde eine kleine Spatelspitze (ca. 5mg) mit sterilem Glaspuder zugesetzt, welcher zuvor mit 0.1N HCl, H_2O, 0.1N NaOH und wiederum H_2O gewaschen und anschließend getrocknet worden war (31), und 3h bei

Raumtemperatur geschüttelt, sodaß die Glaspartikel ständig in Suspension gehalten wurden. Dann wurde ca. 30 sec in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig vom Glaspuder abgehoben. Der Niederschlag wurde in 0.6ml einer Lösung, die zu 7 Teilen aus gesättigter NaJ-Lösung (s.o.) und zu 3 Teilen aus H_2O bestand, aufgenommen und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Glaspartikel mit der gebundenen DNA zweimal mit je 0.6ml 50% Äthanol, 0.1M NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.4 durch je 20-minütiges Schütteln bei RT gewaschen und schließlich die DNA mit 0.1ml 0.2M NaCl, 20mM Tris, 2mM EDTA, pH 7.4 durch 30-minütiges Schütteln bei 37°C von den Glasperlen eluiert. Nach Klarzentrifugieren der Suspension wurde der DNA-haltige Überstand abgehoben und mit 2.5 Vol. Äthanol (-20°C) über Nacht bei -70°C gefällt. Anschließend wurde die DNA 10 min abzentrifugiert, zweimal mit 66%-igem Äthanol gewaschen und nach dem Trocknen in 25µl TE-Puffer gelöst.

2.18. Phosphatase-Behandlung von Vektor-DNA (32)

Insgesamt 5-10µg Restriktions-verdauter Vektor-DNA wurden mit 7U alkalischer Phosphatase 20 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde Nitrilotriessigsäure bis zu einer Endkonzentration von 10mM zugegeben und 45 min bei 65°C inkubiert (33, 34), wobei die Phosphatase-Reaktion vollständig gestoppt werden sollte. Nachdem das Volumen mit H_2O auf 0.2ml gebracht worden war, wurde mit 1 Vol. 0.3M Na-Acetat-gesättigtem Phenol 5 min ausgeschüttelt. Nach

Zentrifugation zur Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgehoben und die Phenolphase mit 1 Vol. 0.3M Na-Acetat nachgewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden anschließend mit 1 Vol. Diäthyläther 5 min ausgeschüttelt und - nach Abheben der Ätherphase - mit 1 Vol. Isopropanol (-20°C) über Nacht bei -70°C gefällt. Nach Abzentrifugieren (10 min) und Nachwaschen mit 66%-igem Äthanol wurde die Phosphatase-behandelte Vektor-DNA getrocknet und in 15µl TE-Puffer aufgenommen.

2.19. "Auffüllen" von überstehenden DNA-Enden mittels des DNA-Polymerase "Klenow"-Fragments

In ein Eppendorf-Reagiergefäß wurden nacheinander 1-3ug restriktionsgespaltener DNA (überstehende Enden!), 2µl 10x"Klenow"-Puffer, je 1µl 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 0.5µl DNA-Polymerase "Klenow"-Fragment gegeben, mit H_2O auf ein Volumen von 20µl gebracht und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde - wie im nächsten Abschnitt beschrieben - mit Polyäthylenglykol ligiert.

2.20. Ligation von DNA

In einem Reaktionvolumen von 20µl wurden nacheinander 0.5-1.5µg der zu ligierenden DNAs in einem Volumen von 13.5µl, 2µl 10xLigationspuffer, 2µl 100mM DTT, 2µl 10mM ATP und 0.5µl T4 DNA-Ligase (1.2U/µl) gegeben, gemischt und über Nacht bei 14°C inkubiert. War die Vektor-DNA vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase behandelt worden, wurden die DNAs im Verhältnis 1:2 (Vektor:"Passagier"-DNA) miteinander ligiert. Wenn die Vektor-DNA jedoch nicht mit Phosphatase behandelt worden war, wurde die "Passagier"-DNA zur Ligation mit der Vektor-DNA im zehnfachen Überschuß zugegeben.

Zunächst nur bei Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden, später auch bei jeder Ligation, wurde dem Ligationsansatz PEG 6000 zu einer Endkonzentration von 15% zugesetzt, da in Gegenwart von Polyäthylenglykol vor allem DNAs mit glatten Enden besser ligieren (35). Ligiert wurden diese Ansätze allerdings nicht bei 14°C, sondern bei RT, ebenfalls über Nacht. Die Ligationsgemische wurden entweder sofort weiterverarbeitet (Gelelektrophorese oder *E.coli*-Transformation) oder bei +4°C (Ligation in Gegenwart von PEG) bzw. -20°C (Ligation ohne PEG) aufbewahrt.

2.21. Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von *E.coli* wurden die beiden im folgenden beschriebenen Methoden verwendet. Da die erstgenannte, die sog. RbCl-Methode zu höheren Transformationsraten führte, wurde meistens nach ihr gearbeitet. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen einzelnen Transformationsansatz.

2.21.1. RbCl-Methode (13)

20ml LB wurden mit einem Einzelklon eines frisch ausgestrichenen *E.coli*-Stammes (*RR1* oder *HB101*) beimpft und bei 36°C bis zur früh-logarithmischen Phase wachsen gelassen (20 KE, Grünfilter). 2ml der Kultur wurden pro Transformationsansatz geerntet (JA-20, 8000 Upm, 4°C, 10 min), in 1ml MOPS-Puffer I (10mM MOPS, ph 7.0, 10mM RbCl) gewaschen, wieder zentrifugiert, in 1ml MOPS-Puffer II (100mM MOPS, pH 6.5, 50mM $CaCl_2$, 10mM RbCl) vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis gehalten. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Zellniederschlag durch Umstülpen des Zentrifugenglases auf Papiertücher getrocknet, in 0.2ml Puffer II aufgenommen und 3µl DMSO sowie ligierte DNA (max. 10µl) zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 40 sec auf 43.5°C erhitzt, 5ml Z-Broth zugegeben und die Zellen 1-1.5h bei 36°C ohne Schütteln wachsen gelassen. Nach Zentrifugation wurden die regenerierten Zellen in 1ml LB suspendiert und auf entsprechend selektive Antibiotika-Platten ausgestrichen. Das Zentrifugenglas wurde nochmals mit 0.4ml LB ausgespült und diese "Verdünnung"

ebenfalls ausplattiert. Die Transformanten waren nach ca. 20h bei 36°C angewachsen und ihre Plasmid-DNA konnte nach der oben beschriebenen Miniscreen-Methode (2.11.3.) isoliert werden.

2.21.2. $CaCl_2$-Methode (36)

5ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie eines frisch ausgestrichenen *E.coli*-Stammes (*RR1* oder *HB101*) beimpft und bei 36°C bis zur mittel-logarithmischen Phase wachsen gelassen (30 KE, Grünfilter). Die Zellen wurden geerntet (JA-20, 8000 Upm, 4°C, 5 min) und in 0.5ml 30mM $CaCl_2$, 10mM Tris, pH 8.0 resuspendiert. Nach 15 min auf Eis wurde wieder - wie oben - zentrifugiert, die Zellen in 0.05ml der obigen $CaCl_2$-Lösung aufgenommen, in Eppendorf-Hütchen transferiert und die zu transformierende DNA zugegeben. Es wurde dann 15 min auf Eis, 2 min bei 36°C, 1 min auf Eis und schließlich 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden in 1ml LB bei 36°C ohne Schütteln wachsen gelassen und nach Ausplattieren auf entsprechend selektive Platten im Brutschrank bei 36°C gehalten. Die Plasmid-DNAs der nach ca. 20h auftretenden Einzelkolonien wurden anschließend nach der Miniscreen-Methode isoliert.

2.22. Transfektion von *E.coli 71-18* bzw. *JM105* (37)

Für die an F-Pili adsorbierenden M13-Phagen wurde dementsprechend der F'-Plasmid tragende *E.coli*-Stamm *71-18* bzw. *JM105* verwendet, der zudem unter der Kontrolle des F'-Faktors eine defekte ß-Galaktosidase erzeugt, die durch ein von M13 kodiertes ß-Galaktosidase-Fragment komplementiert wird, falls keine Insertion von "Fremd"-DNA in den M13-Vektor erfolgte (Selektion rekombinanter M13-Phagen mit dem Lactose Analogon X-Gal anhand der ausbleibenden Blaufärbung).

Zellen von *E.coli 71-18* wurden von einer Glucose/Minimal-Platte in 2ml 2xTY suspendiert und über Nacht bei 36°C auf einer Rolltrommel inkubiert. 100ml 2xTY wurden mit 0.5ml dieser Vorkultur beimpft und bei 36°C im Schüttler bis zu einer Zelldichte von 40-50 KE (Grünfilter) wachsen gelassen. Geerntet wurde in verschließbaren JA-20-Gefäßen (8000 Upm, 4°C, 5 min) und der Zellniederschlag wurden in 0.5 Vol. (50ml) 4°C kaltem 50mM $CaCl_2$ resuspendiert. Die beim Ernten im Kolben verbleibende Zellsuspension (ca. 0.5-1ml) wurde nach Zugabe von 20-30ml 2xTY weiter bei 36°C geschüttelt, um später frische Zellen zur Verfügung zu haben. Nach 20 min auf Eis wurden die $CaCl_2$-behandelten Zellen wie oben abzentrifugiert und schließlich in 0.1 Vol. (10ml) kaltem $CaCl_2$ aufgenommen. Danach wurden sie in Portionen von je 0.3ml auf kleine Reagenzgläser verteilt, die DNAs zugegeben, 40 min auf Eis inkubiert, 3 min bei 42°C gehalten und anschließend wieder auf Eis abgeschreckt. Je Transformationsansatz wurden nun bei RT

nacheinander 20µl 0.1M IPTG, 20µl X-Gal (2% in deionisiertem Dimethylformamid), 0.2ml frische *E.coli 71-18*-Zellen und 3ml H-Top-Agar (nach dem Autoklavieren bei 42°C flüssig gehalten) zugegeben. Durch Rollen des Reagenzglases zwischen beiden Händen wurde schnell gemischt und sofort auf H-Platten gegossen. Die Platten wurden, nachdem der Agar fest geworden war, bei 36°C im Brutschrank solange inkubiert (6-12h), bis die Plaques im Bakterienrasen deutlich zu sehen waren (blaue Plaques: nur Vektor-DNA; weiße Plaques: Vektor mit klonierter DNA). Aus diesen Plaques konnte dann die doppelsträngige Phagen-DNA (replikative Form) nach der in 2.12. beschriebenen Methode isoliert werden.

2.23. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* (38)

Von einem Zellausstrich einer zu transformierenden Hefe-Mutante wurden 5ml YEP/FS-Flüssigmedium angeimpft und mindestens 24h bei 30°C auf einer Rolltrommel inkubiert. 2-5ml dieser Vorkultur wurden in 100ml YEP/FS-Hauptkultur gegeben, die durchschnittlich 20h bei 30°C bis zu einer Zelldichte zwischen 1.2 und $5x10^7$ Zellen/ml geschüttelt wurde. Die Zelldichte wurde kolorimetrisch im Klett-Photometer oder mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern mit Schraubverschluß geerntet (JA-14, 6000 Upm, 4°C, 3 min), in 10ml H_2O resuspendiert und in kleine Zentrifugengläschen überführt. Anschließend wurden die Zellen in der Tischzentrifuge (Heräus Christ, 2500 Upm, 2 min, Festwinkelrotor) sedimentiert, in 10ml SED (s. 2.4.) aufgenommen und 3.5µl Mercaptoäthanol zugegeben.

Nach 10-minütiger Inkubation bei 30°C wurde wie oben in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Niederschlag zweimal mit 1M Sorbit gewaschen und die Zellen in 10ml SCE, pH 5.8 (s. 2.4.) suspendiert. Von dieser Suspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl je zweimal 0.1ml einer 10^{-4} und 10^{-5} Verdünnung in H_2O auf YEP/FS-Agar ausplattiert. Die unverdünnte Zellsuspension wurde nun mit 150µl Zymolyase-Lösung (ca. 4mg Zymolyase/ml SCE) versetzt und bei 30°C im Wasserbad 30-60 min inkubiert. Das Fortschreiten der Sphäroplastierung wurde durch Mischen eines Tropfens Zellsuspension mit einem Tropfen 2%-iger SDS-Lösung auf einem Objektträger mikroskopisch verfolgt. Bei Erreichen eines geschätzten Sphäroplasten-Gehaltes von ca. 90% wurde zur Bestimmung des genauen Anteils nicht-sphäroplastierter Zellen je zweimal 0.1ml einer 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnung in H_2O (osmotische Lyse der Sphäroplasten) auf YEP/FS-Agar ausplattiert. Die Anzahl hierbei auswachsender, nicht-sphäroplastierter Zellen wurde zu der anfangs bestimmten Gesamtzellzahl (s.o.) in Relation gesetzt.

Die Sphäroplasten wurden in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, dreimal mit 1M Sorbit und einmal mit 10ml CaS (s. 2.4.) gewaschen. Anschließend wurden die Sphäroplasten in 1-2ml CaS aufgenommen und zu je 150µl in Eppendorf-Reagiergefäße portioniert. Zur Bestimmung der Gesamtzahl überlebender und regenerierbarer Zellen von einer 0.1ml Portion eine Verdünnungsreihe in 1M Sorbit hergestellt. Von den Verdünnungsstufen 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} wurden je 0.1ml in 8ml Regenerationsagar (s. 2.5.2.) gegeben und auf YEP- bzw.YEP/FS-Agar (mit 1M Sorbit) ausgegossen. Auch die Zahl der hierbei auswachsenden Zellen wurde auf die eingangs bestimmte

Gesamtzellzahl bezogen.

Zur Transformation der Sphäroplasten wurden dann pro Portion 20µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 10-20µl zugegeben und danach 20 min bei RT inkubiert. Eine Portion blieb jeweils ohne DNA und diente als positive Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml PEG 4000 in 10mM $CaCl_2$, 10mM Tris, pH 7.4 versetzt, 20 min bei RT stehen gelassen und danach kurz zentrifugiert (15 sec, Eppendorf-Zentrifuge). Der Niederschlag wurde in 150µl SOS (s. 2.5.2.) aufgenommen und 20 min bei 30°C inkubiert. Zum Ausplattieren wurde der jeweilige Transformationsansatz in 8ml Selektions-Top-Agar (nach dem Autoklavieren bei 45°C flüssig gehalten) gegeben und nach Durchmischen auf selektive Regenerationsagar-Platten (YEP- bzw. YEP/FS-Agar mit 1M Sorbit) verteilt. Nach dem Festwerden des Agars wurden die Platten bis zum Auftreten von Kolonien (ca. 5 Tage) in einem Brutschrank bei 30°C inkubiert.

Bei Transformation von *fas2/trp1*-Doppelmutanten mit *TRP1/ARS1*-haltigen *FAS2*-Subklonen wurde zuerst auf *TRP1*-Transformanten selektioniert. Diese *TRP1*-Prototrophen wurden danach einzeln von den Selektions-Top-Agar-Platten auf -T/FS-Platten gepickt, hierauf 2-3 Tage bei 30°C inkubiert und zur Feststellung des Anteils *FAS*-Prototropher auf YEP-Platten überstempelt.

2.24. Mitotische Stabilität von *S. cerevisiae*-Transformanten

Zellen einer auf YEP-Agar frisch klonierten Transformanten-Kolonie wurden in H_2O zu einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml suspendiert. Diese Suspension wurde dann nach entsprechender Verdünnung (Endstufe 10^{-4}) auf YEP/FS-Agar ausplattiert und die Platten 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Nach Erscheinen kleiner Kolonien wurden diese auf jeweils eine YEP und -T/FS Platte überstempelt. Die Platten wurden ebenfalls für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert, danach die angewachsenen Kolonie-Abdrücke auf beiden Platten ausgezählt und die Prozentwerte, bezogen auf die Kolonienzahl der YEP/FS-Platte, berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Konstruktion der Vektoren pMS 202 und pMS 203

Nach Klonierung der *FAS2*-DNA in Form eines Plasmides mit 23.77 kb inserierter Hefe-DNA, sollte - analog zu vorangegangenen Versuchen mit klonierter *FAS1*-DNA (10) - die Reihenfolge der drei *FAS2*-Domänen durch Transformation definierter *fas2*-Mutanten mit subklonierter *FAS2*-DNA bestimmt werden.
Die in vorangegangenen Versuchen von M. Schweizer (39) als pMS 2583 klonierte *FAS2*-DNA lag zunächst als 23.77 kb großes *BamHI*-Fragment (s.o.) im Vektor pMS 201 (9) vor. Die darin enthaltene Hefe-DNA war mit 23.77 kb mit Sicherheit wesentlich mehr als das voraussichtlich nur ca. 7 kb große *FAS2*-Gen. Deshalb war von H.J. Höltke bereits derjenige Bereich in pMS 2583, der für die α-Untereinheit der Fettsäuresynthetase kodiert, durch "Northern"-Hybridisierungsexperimente zwischen *FAS2*-mRNA und definierten pMS 2583-Teilbereichen (40) näher eingegrenzt worden (vgl. Abb.2).
Eine weitere Voraussetzung für die Subklonierung von *FAS2*-Fragmenten war eine genaue Restriktionskartierung des Plasmides pMS 2583. Diese war von T. Laux im Rahmen seiner Diplomarbeit (41) durchgeführt worden und ist hinsichtlich ihres Ergebnisses in Abb.2 wiedergegeben.

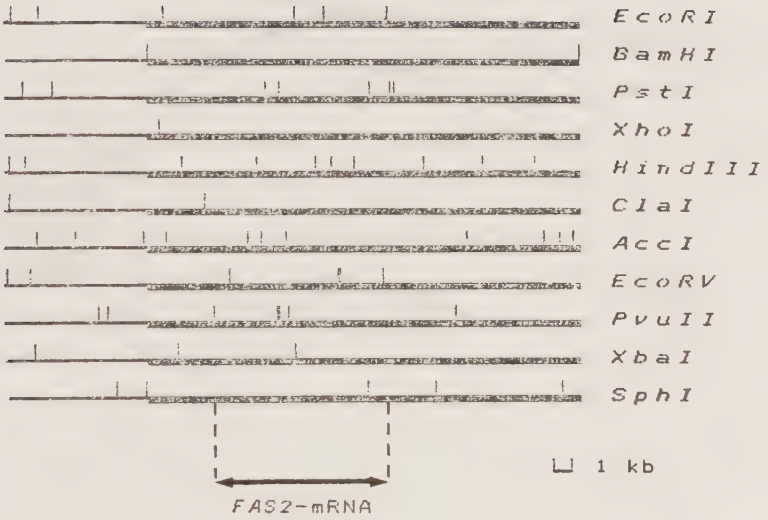


Abb.2: Restriktionskarte des *FAS2*-Plasmids pMS 2583 nach T. Laux (41)

Die dünne Linie gibt den Vektoranteil, die dicke Linie den Bereich der Hefe-DNA an. Der für die α-Untereinheit kodierende Genbereich ist entsprechend den Daten von H.J. Höltke (40) eingetragen.

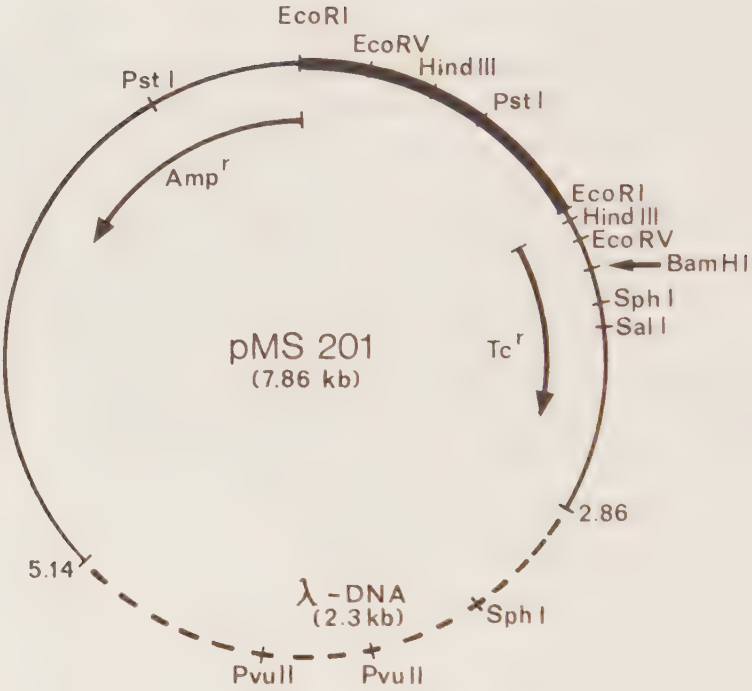


Abb.3: Restriktionskarte des Cosmid-Vektors pMS 201 (9)

Der Vektor pMS 201 wurde durch Insertion des 1.45 kb *EcoRI*-Fragmentes aus pLC 544, welches das *TRP1*-Gen und eine Hefe-DNA Replikatorsequenz (*ARS1*) enthält, in pHC 79 erhalten (42). In pMS 2583 wurde ein das *FAS2*-Gen enthaltendes *BamHI*-Fragment der Hefe-DNA in die einzige *BamHI*-Schnittstelle des Vektors (dicker Pfeil) inseriert.

Aus der Restriktionskarte von pMS 2583 wird deutlich, daß sich zur Subklonierung grundsätzlich die Restriktionsendonukleasen *EcoRV*, *PstI*, *EcoRI*, *PvuII*, *HindIII*, *AccI* und *SphI* eignen, während *XhoI*, *ClaI* und *XbaI* wegen fehlender Schnittstellen im vermuteten *FAS2*-Bereich des Plasmides nicht geeignet sind.

Als ein für Hefetransformationen besonders gut geeigneter Vektor stand am hiesigen Institut das Plasmid pMS 201 zur Verfügung (siehe Abb.3). Dieser Hefe/*E.coli*-"shuttle"-Vektor enthält den *TRP1/ARS1*-Bereich des Hefegenoms, eine Sequenz, welche für die Selbstreplikation des Plasmids in Hefe und für die Transformation von *trp1*-Mutanten zu *TRP*-Prototrophie notwendig ist. Die oben erwähnten Restriktionsendonukleasen *EcoRV*, *PstI* und *HindIII* kamen für eine Subklonierung des *FAS2*-Gens letztlich doch nicht in Frage, weil - wie aus Abb.3 zu ersehen ist - diese Enzyme innerhalb des *TRP1/ARS1*-Fragmentes im Vektor schneiden, wodurch die Funktionsfähigkeit dieser Sequenz nicht mehr gewährleistet ist. Die Subklonierung mit *SphI* erschien zunächst nicht sinnvoll, da innerhalb der vermuteten *FAS2*-Sequenz nur eine einzige Schnittstelle liegt. Auch *AccI* eignete sich bei genauerer Betrachtung nicht für eine Subklonierung, da bei der Verdauung von pMS 2583 mit *AccI* mehrere, nahezu gleich große und somit schlecht voneinander unterscheidbare, Fragmente entstehen.
Als zur Subklonierung geeignete Restriktionsfragmente blieben somit nur noch *EcoRI*- und *PvuII*-Fragmente übrig.
Um bei der Klonierung von *EcoRI*-Fragmenten zu vermeiden, daß das 1.45 kb große *TRP1/ARS1*-haltige *EcoRI*-Fragment des

Vektors verlorengeht, wurde der Vektor pMS 201 so verändert, daß dabei eine der beiden *EcoRI*-Schnittstellen in pMS 201 eliminiert wurde. Zu diesem Zweck wurde der Vektor partiell mit *EcoRI* verdaut, sodaß nur eine der beiden *EcoRI*-Schnittstellen geöffnet wurde, und anschließend wurden die beiden dabei entstandenen cohäsiven Enden mit DNA-Polymerase I "Klenow"-Fragment, aufgefüllt. Wie Abb.4 zeigt, ist bei einer bis zu 10 min dauernden *EcoRI*-Einwirkung eine scharfe DNA-Bande in einer Position zu sehen (Pfeil), die der Größe des linearisierten Plasmides entspricht. Bei längerer RE-Einwirkungsdauer tritt auch ein Fragment in Erscheinung (Doppelpfeil), welches dem *TRP1/ARS1*-freiem Restfragment des Vektors entspricht. Nach Religation der linearisierten und mit DNA-Polymerase aufgefüllten pMS 201-DNA wurde nach *E.coli* transformiert und die Plasmid-haltigen Klone durch Restriktionsverdauung charakterisiert. Das geschilderte experimentelle Verfahren ist in Abb.5 schematisch dargestellt.

Wie aus Abb.5 und 6 hervorgeht, sollten und konnten neben dem ursprünglichen Vektor pMS 201 tatsächlich auch die beiden Plasmide pMS 202 und pMS 203 isoliert und identifiziert werden.

Bei einer *EcoRI/SalI*-Doppelverdauung wird pMS 201 in drei Fragmente (5.76 kb, 1.45 kb, 0.65 kb) zerschnitten, wie aus Abb.6 hervorgeht. Demgegenüber ergibt eine *EcoRI/SalI*-Doppelverdauung der neu-konstruierten Vektoren pMS 202 und pMS 203 nur jeweils zwei Fragmente, nämlich ein 5.76 kb und ein 2.1 kb großes DNA-Fragment bei pMS 202 bzw. ein 7.21 kb und 0.65 kb großes Fragment bei pMS 203. Der Vektor pMS 202 hat somit die "rechte" (vgl. Abb.6) und pMS 203 die "linke" *EcoRI*-Schnittstelle (vgl. Abb.6) verloren.

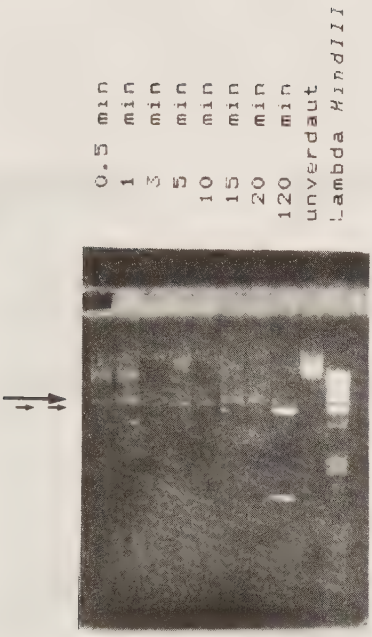


Abb.4: Partielle *EcoRI*-Verdauung von pMS 201

20µg Plasmid-DNA pMS 201 wurden in einem Volumen von 20µl mit 1.5U *EcoRI* bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 3µl dem Verdauungsansatz entnommen und das Enzym durch 10min Erhitzen auf 65°C inaktiviert. Von den zu verschiedenen Zeiten gestoppten Ansätzen wurde jeweils 0.5µl auf ein 0.8% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoresiert. Das Spaltmuster wurde nach Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.
Pfeil : einfach aufgeschnittene pMS 201-DNA
Doppelpfeil: pMS 201-DNA nach Eliminierung von *TRP1/ARS1* als 1.45 kb *EcoRI*-Fragment.

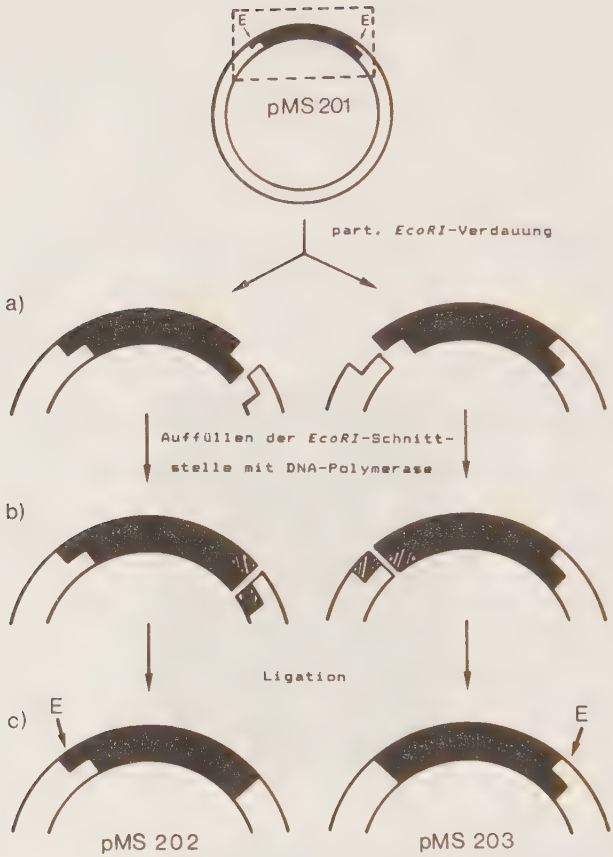


Abb.5: Konstruktionsschema der beiden Vektoren pMS 202 und pMS 203 aus pMS 201

pMS 201 enthält das *TRP1/ARS1* *EcoRI*-Fragment aus Hefe (dunkel gezeichnet).
Das partielle Aufschneiden von pMS 201 mit *EcoRI* (a) führt nach Auffüllen der einzelsträngigen Sequenzen (schraffiert gezeichnet) (b) und anschließender Religation des Vektors (c) zum Verlust entweder der "rechten" (pMS 202) oder der "linken" (pMS 203) *EcoRI*-Schnittstelle (=E).

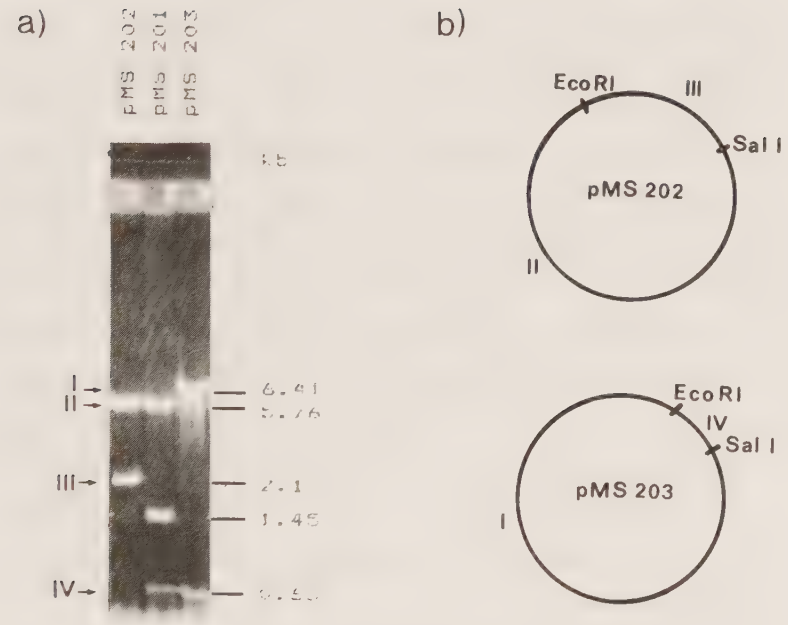


Abb.6: *EcoRI/SalI*-Doppelverdauung der neu-konstruierten Vektoren pMS 202 und pMS 203

(a) Aus Einzelklonen isolierte Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI/SalI* gespalten. Als Vergleich diente *EcoRI/SalI*-gespaltene pMS 201-DNA.
(b) Erwartete Lage von *EcoRI*- und *SalI*-Schnittstellen in pMS 202 bzw. pMS 203, gemäß Abb.3.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

3.2. Subklonierung von *FAS2*-Restriktionsfragmenten

3.2.1. Klonierung von *EcoRI*-Fragmenten in dem Vektor pMS 202

Nachdem die Vektoren pMS 202 bzw. pMS 203 in der gewünschten Weise konstruiert worden waren (siehe 3.1), war es möglich, *EcoRI*-Restriktionsfragmente von pMS 2583 in diese Plasmide zu klonieren. Zu diesem Zweck wurden pMS 202 bzw. pMS 203 mit *EcoRI* vollständig gespalten. Nach elektrophoretischer Kontrolle der Vollständigkeit der Verdauung wurden die 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase entfernt, um eine Religation des Vektors mit sich selbst zu verhindern. Dies erschien angebracht, da die *EcoRI*-Schnittstelle in beiden Vektoren außerhalb des Ampicillin- bzw. des Tetracyclin-Resistenzgens liegt und es somit nicht möglich war, Hybridklone von religiertem Vektor durch Selektion auf entsprechende Antibiotika-Platten zu unterscheiden.

Nach Ligation der so vorbehandelten Vektor-DNA mit vollständig *EcoRI*-verdauter pMS 2583-DNA wurden mit dem Ligationsgemisch *E.coli*-Zellen transformiert. Aus Transformanten-Klonen wurde die Plasmid-DNA nach dem Miniscreen-Verfahren isoliert und durch Restriktionsanalyse charakterisiert.

Zum Subklonieren der pMS 2583-*EcoRI*-Fragmente wurde zunächst der Vektor pMS 203 verwendet, bei dem nur die "rechte" (vgl. Abb.6) *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors noch vorhanden ist. Im Verlauf der Untersuchungen wurde allerdings festgestellt, daß bei

der Konstruktion von pMS 203 durch das "Auffüllen" der *EcoRI*-Schnittstelle offenbar ca. 200 bp zusätzliche, nicht näher definierte DNA-Sequenzen eingefügt worden waren. Bei der *EcoRI/SalI*-Restriktionsanalyse der neu-konstruierten Vektoren (Abb.6) war diese zusätzliche DNA nicht aufgefallen, da in dem dabei verwendeten Gelsystem Fragmentgrößen zwischen 2 und 9 kb höchstens auf 0.5 kb genau bestimmt werden können. Bei einer späteren Restriktionsverdauung der Vektoren mit *PstI* wurde jedoch deutlich, daß das dabei entstehende 1.58 kb große Fragment in pMS 203, nicht jedoch in pMS 201 und pMS 202, um ca. 200 bp größer ist als theoretisch erwartet (vgl. Abb.7). Bei der Transformation von *S.cerevisiae trp1*-Mutanten und von *E.coli* mit pMS 203 wurde zwar keine störende Wirkung dieser zusätzlichen DNA-Sequenz nachgewiesen, trotzdem wurde für alle weiteren Subklonierungsexperimente nur noch der Vektor pMS 202 verwendet.

In Abb.8 sind die Restriktionsmuster von sechs Plasmiden gezeigt, die bei dieser Subklonierung von *EcoRI*-Fragmenten in pMS 202 erhalten wurden. Wie aus Tab.1 hervorgeht, wurden insgesamt elf verschiedene Plasmide isoliert. Die Orientierung der *EcoRI*-Fragmente im Vektor wurde für diese Plasmide durch Verdauung mit Restriktionsenzymen bestimmt, deren Schnittstellen in der Vektor- und Hefe-DNA so lagen, daß aus den resultierenden Fragmentgrößen eindeutig auf die Orientierung der *FAS*-DNA im Plasmid geschlossen werden konnte. Wenn die Orientierung der subklonierten Hefe-DNA im Vektor gleichsinnig zu derjenigen in pMS 2583 war, wurde sie als positiv (+) festgelegt. Alle Subklone mit umgekehrter Orientierung wurden als negativ (-) bezeichnet.

Als Beispiel für die Bestimmung der Orientierung eines subklonklonierten Fragments im Vektor sei pMS 3247 aufgeführt. Das gesamte pMS 3247-Plasmid ist 11.4 kb groß und besitzt vier *HindIII*-Schnittstellen, zwei davon im Vektor und zwei in der inserierten *FAS*-DNA (vgl. Abb.2 und Abb.14). Bei positiver Orientierung sollten sich nach *HindIII*-Spaltung vier Fragmente von 0.9 kb, 1.0 kb, 1.3 kb und 8.2 kb, bei negativer Orientierung ebenfalls vier, jedoch von 0.9 kb, 1.3 kb, 2.5 kb und 6.7 kb Größe ergeben. Tatsächlich gefunden wurden Fragmente der erstgenannte Größenverteilung (vgl. Abb.8). Der Klon pMS 3247 hat also die Orientierung +.

Umgekehrt enthält das Plasmid pMS 3248 zwar das gleiche *EcoRI*-Fragment wie pMS 3247, in diesem Fall jedoch in "negativer" Orientierung in den Vektor eingebaut, wie aus der Restriktionsanalyse mit *HindIII* zu sehen ist (vgl. Abb.8).

Die Orientierung der anderen Subklone wurde analog ermittelt.

Die Ergebnisse sind in Tab.1 zusammengefaßt und graphisch in Abb.14 dargestellt. Bei Transformationsversuchen (L. Roberts, unveröffentlichte Ergebnisse) von *fas2*-Mutanten der Hefe konnte ein Einfluß der Orientierung auf die Transformationsraten nicht festgestellt werden.

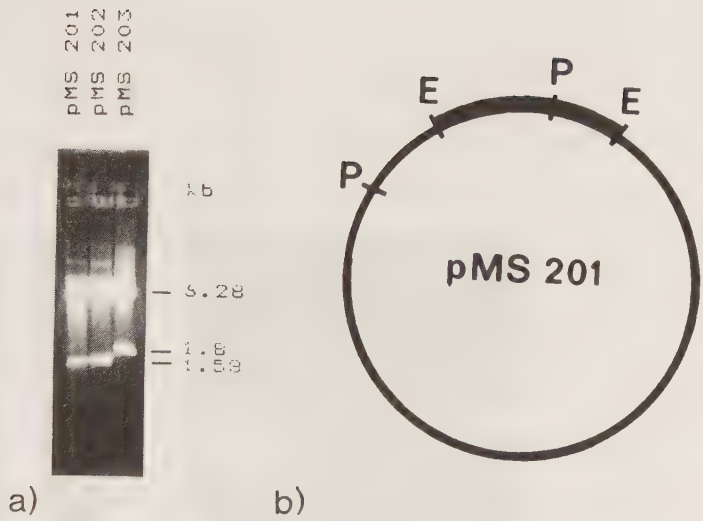


Abb.7: *PstI*-Restriktionsmuster der Vektoren pMS 201, pMS 202 und pMS 203

(a) Je 1.5µg Plasmid-DNA wurden mit *PstI* gespalten und elektrophoretisch in einem 0.8% Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Etbr-Färbung wurden die DNA-Banden unter UV-Licht photographiert.
(b) Lage der *PstI*(P)- und *EcoRI*(E)-Schnittstellen in pMS 201, gemäß Abb.3.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

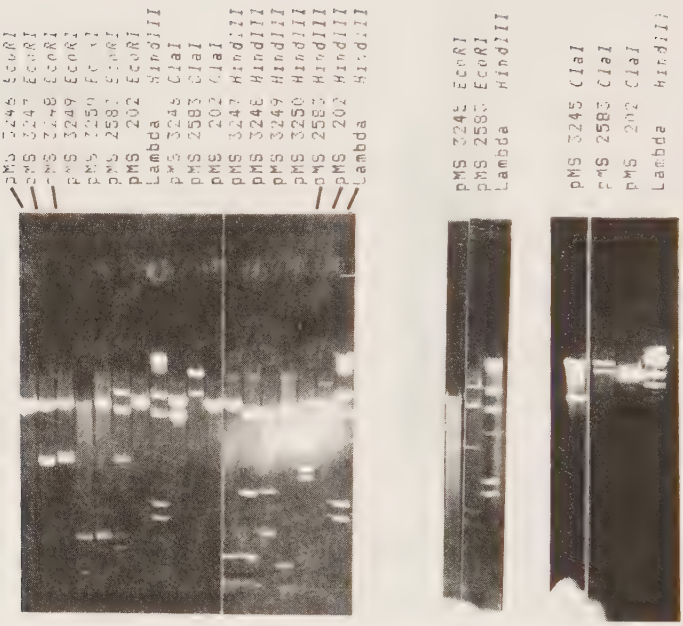


Abb.8: Restriktionsanalyse verschiedener *EcoRI*-Subklone aus pMS 2583 zur Bestimmung der *FAS2*-Fragment Orientierung im Vektor pMS 202

Je 1µg der verschiedenen Plasmid-DNAs wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und die Bandenmuster im Gel nach Elektrophorese (0.8% Agarose) und Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Die Lage der subklonierten DNA-Fragmente innerhalb des *FAS2*-Bereichs ist aus Abb.14 ersichtlich.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

Nach der getrennten Subklonierung einzelner *EcoRI*-Fragmente in pMS 202 sollte als nächstes auch versucht werden, die drei *EcoRI*-Fragmente (7.28 kb, 1.66 kb, 3.5 kb aus pMS 2583) hintereinander in den neuen Vektor einzubauen. Die Eingrenzung der *FAS2*-Transkriptionsregion innerhalb von pMS 2583 hatte nämlich ergeben, daß das *FAS2*-Gen sehr wahrscheinlich im Bereich dieser drei Fragmente liegt (40). Durch Subklonierung der drei *EcoRI*-Fragmente als ganzes sollte somit überschüssige, hier nicht weiter interessierende Hefe-DNA aus dem Plasmid pMS 2583 eliminiert werden. Zur Subklonierung der genannten drei Fragmente wurde das Plasmid pMS 2583 partiell mit *EcoRI* verdaut und das Spaltgemisch auf das Vorhandensein eines Fragmentes der gewünschten Größe (12.5 kb) überprüft.

Wie in Abb.9 dargestellt ist, konnten nach einigen Vorversuchen Bedingungen gefunden werden, unter denen ein Fragment der genannten Größe tatsächlich entstand. Die DNA eines Ansatzes, der 30 sec mit *EcoRI* inkubiert worden war (vgl. Abb.9), wurde - nach Inaktivierung des Enzyms - mit *EcoRI*-gespaltenem, Phosphatase-behandeltem Vektor pMS 202 ligiert. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend nach *E.coli* transformiert und aus einer größeren Zahl der dabei entstehenden Einzelklone die Plasmid-DNA nach dem Miniscreen-Verfahren isoliert. Unter ca. 200 untersuchten Klonen wurden Plasmide gefunden, welche das gesuchte 12.5 kb Fragment jeweils in einer der beiden möglichen Orientierungen enthielten. In Abb.10 sind die Restriktionsmuster der beiden Klone pMS 3243 und pMS 3244 dargestellt. Daneben traten auch Plasmide auf, die nur eines oder zwei der drei fraglichen *EcoRI*-Fragmente enthielten. Das Plasmid pMS 3243 enthält die

drei *EcoRI*-Fragmente hintereinander in positiver und pMS 3244 in negativer Orientierung in dem Vektor pMS 202. In Tabelle 1 sind neben vielen anderen, in dieser Arbeit isolierten Plasmiden auch alle bei diesem Klonierungsexperiment erhaltenen Klone zusammengefaßt und beschrieben.

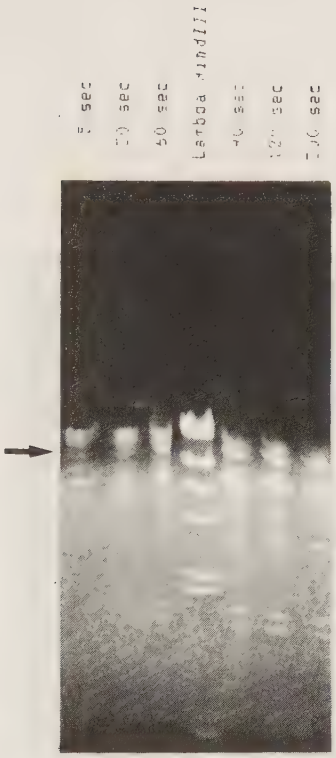


Abb.9: Partielle *EcoRI*-Spaltung von pMS 2583

50µg Plasmid-DNA pMS 2583 wurden in einem Volumen von 60µl mit 10U *EcoRI* bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden je 10µl dem Verdauungsansatz entnommen und das Enzym durch 10min Erhitzen auf 60°C inaktiviert. Von jeder der entnommenen Proben wurde 1µl auf ein 0.8% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoresiert. Das Bandenmuster im Gel wurde nach Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.
Pfeil: Position des im Text erwähnten, gesuchten 12.5 kb-Fragmentes.

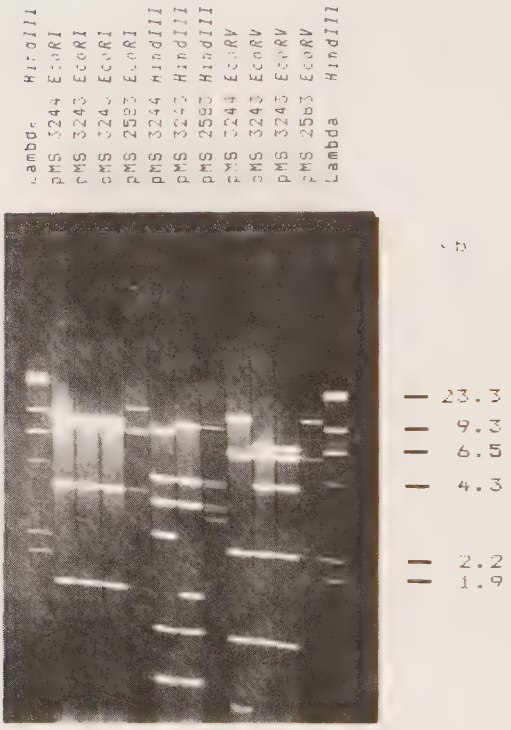


Abb.10: Restriktionsanalyse der *FAS2*-Subklone pMS 3243 und pMS 3244

Je 2µg Plasmid-DNA (pMS 3243 bzw. pMS 3244) wurden - wie in MATERIAL UND METHODEN angegeben - gespalten und die Spaltmuster nach Agarose-Gelelektrophorese (0.8%) und Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.

3.2.2. Einbau von *PvuII*-Fragmenten aus pMS 2583 in den Vektor pMS 201 und Bestimmung ihrer Orientierung darin

Um eine weitere Unterteilung des *FAS2*-Genbereichs für Transformationszwecke zu erreichen, wurden außer den im vorangegangenen Abschnitt erwähnten *EcoRI*-Fragmenten auch noch einige ausgesuchte *PvuII*-Restriktionsfragmente des *FAS2*-Klons pMS 2583 subkloniert. Zu diesem Zwecke wurde *PvuII*-gespaltene pMS 2583-DNA in den Vektor pMS 201 eingebaut. Dieser Vektor hat zwei *PvuII*-Schnittstellen, die 0.54 kb voneinander entfernt in der "cos"-Region von pMS 201 liegen (vgl. Abb.3). Da diese Region nur für die Bakterien-Transfektion, nicht aber für "einfache" Bakterientransformation notwendig ist, spielte es keine Rolle, wenn dieses kleine *PvuII*-Fragment des Vektors bei der Klonierung verlorenging. Das mit *PvuII* vollständig gespaltene Plasmid pMS 201 (elektrophoretische Kontrolle) wurde vor der Ligation mit den *PvuII*-Fragmenten des Klons pMS 2583 mit alkalischer Phosphatase behandelt (siehe MATERIAL UND METHODEN, 2.18). Diese Behandlung war notwendig, da - wegen der Lage der *PvuII*-Schnittstellen außerhalb des Ampicillin- bzw. Tetracyclin-Resistenzgens - Hybridklone nicht durch Ausplattieren oder Stempeln der Transformanten auf entsprechende Antibiotika-Platten von Zellen mit einfach religiertem Vektor unterschieden werden konnte. Nach Ligation mit Phosphatase-behandelter Vektor-DNA mußten nur ca. 70 Klone untersucht werden, um die gewünschten Plasmide zu finden. Ohne

Phosphatase-Behandlung hätte ein Vielfaches dieser Transformantenzahl übergeprüft werden müssen.

Alle in diesem Zusammenhang erhaltenen Plasmide sind in Tab.1 aufgeführt. Ebenso sind in dieser Tabelle die Orientierung der klonierten Fragmente im Vektor und die Größe der subklonierten Fragmente (41) aufgeführt. Die Orientierung der Fragmente innerhalb der Vektor-DNA wurde auf die schon oben besprochene (siehe 3.2.1.) Art bestimmt. Experimentelle Daten dazu sind in Abb.11 und 12 enthalten.

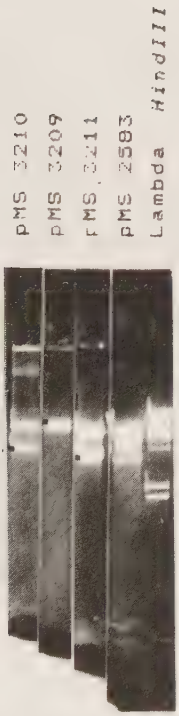


Abb.11: *PvuII*-Restriktionsmuster ausgewählter *FAS2*-Subklone

Je 1µg Plasmid-DNA wurde mit *PvuII* verdaut und das Spaltmuster nach Elektrophorese in einem 0.8% Agarose-Gel und Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Die Restriktionsdaten vieler ebenfalls untersuchter, aber die gesuchten *PvuII*-Fragmente nicht enthaltender Plasmide, sind nicht gezeigt.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.
Punktiert: Aus pMS 2583 subklonierte *PvuII*-Fragmente.

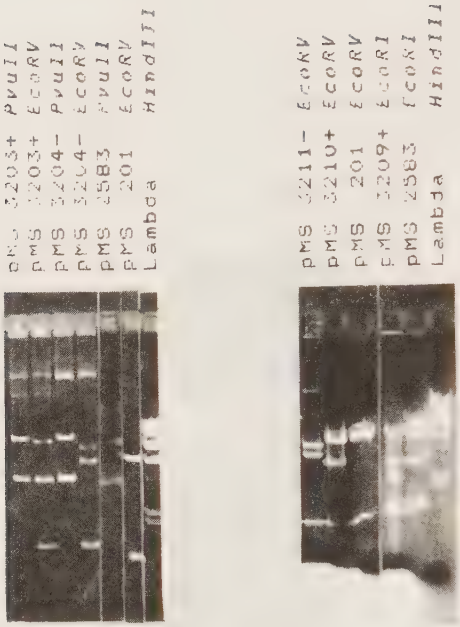


Abb.12: Charakterisierung der Orientierung der *FAS2*-Insertionen im Vektor pMS 201

Je 1µg Plasmid-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und die Spaltgemische anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Etbr-Färbung wurde das Gel (0.8%) unter UV-Beleuchtung photographiert. Die aus der Restriktionskarte (Abb.2) und den gezeigten Restriktionsmustern abgeleitete Orientierung des inserierten Fragments ist hinter der Plasmid-Nummer mit "+" bzw. "-" angegeben (vgl. Tab.1).
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

3.2.3. Klonierung von *FAS2*-Restriktionsfragmenten in M13-Vektoren

Neben Transformationsversuchen mit subklonierter *FAS2*-DNA sollte die Nukleotid-Sequenz der klonierten *S.cerevisiae* *FAS2*-DNA bestimmt werden. Hierzu sollte die von Messing et al. (43) modifizierte Sanger'sche Dideoxynukleotid-Terminationsmethode (44) eingesetzt werden. Dafür war es notwendig, die zu sequenzierenden Restriktionsfragmente aus den Vektoren pMS 201 und pMS 202 in M13-Sequenzierungsvektoren umzuklonieren.
Als Ausgangsmaterial für die im folgenden beschriebenen Versuche wurde nicht das Plasmid pMS 2583 gewählt, sondern die daraus - wie in 3.2.1. und 3.2.2. beschrieben - abgeleiteten *FAS2*-Subklone in den Vektoren pMS 201 und pMS 202. Das bot den Vorteil, daß alle nach der Transfektion von *E.coli* mit M13-Derivaten entstehenden weißen Plaques nur dieses eine *FAS2*-Fragment in den M13-Phagen eingebaut enthielten. Dadurch konnte ein längeres Suchen nach bestimmten Fragmenten vermieden werden.
Zur Umklonierung der in pMS 3249 bzw. pMS 3210 enthaltenen *FAS2*-DNA in M13-Vektoren wurde zunächst die betreffende Plasmid-DNA mit einer bestimmten RE gespalten und die Vollständigkeit der Verdauung durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die verwendeten M13-Derivate enthalten in einem sog. "Polylinker"-Bereich Schnittstellen für elf bzw. dreizehn gängige Restriktionsendonukleasen (15, 45). Im nächsten Schritt wurden die Vektor- und Plasmid-DNA Fragmente miteinander ligiert. Anschließend wurde mit der religierten Phagen-DNA der *E.coli*-Stamm

71-18 bzw. *JM105* transfiziert. Durch Miniscreen-Analyse der dadurch induzierten weißen Plaques bzw. der in ihnen enthaltenen Phagen-DNA wurden die Klone mit den gesuchten *FAS2*-Fragmenten identifiziert (siehe Abb.13). Die Orientierung des Hefe-Fragmentes innerhalb des M13-Vektors wurde - wie oben beschrieben (3.2.1.) - durch Restriktionsanalyse der doppelsträngigen Phagen-DNA ermittelt.

Für die Umklonierung des 3.63 kb großen *PvuII*-Fragmentes aus pMS 3210 konnte der Vektor M13 mp18 nicht mit *PvuII* gespalten werden, da diese Endonuklease in der doppelsträngigen Phagen-DNA mehrere Schnittstellen hat. Deshalb wurde in solchen Fällen der Vektor M13 mp18 mit *SmaI* gespalten, einem Restriktionsenzym, das - ebenso wie *PvuII* - glatte Enden liefert. Nach Ligation und Transfektion kann allerdings ein auf diese Weise in die Phagen-DNA eingebautes *FAS2*-Fragment nicht mehr mit *PvuII* oder *SmaI* herausgeschnitten werden, da beide Erkennungsstellen bei der heterologen *PvuII/SmaI*-Ligation verlorengegangen sind. Diese Schwierigkeit konnte, wenn nötig, dadurch umgangen werden, daß mit den zwei Enzymen *SstI* und *SalI* verdaut wurde, von denen das eine seine einzige Schnittstelle rechts und das andere links von der ursprünglichen *SmaI*-Erkennungsstelle im Vektor hat. Auf diese Weise konnte durch *SstI/SalI*-Doppelverdauung die Umklonierung des in pMS 3210 enthaltenen *PvuII*-Fragmentes nachgewiesen und seine Orientierung durch Restriktionsspaltung mit *HindIII* festgestellt werden (siehe Abb.13).

Weitere Experimente zur Klonierung von *FAS2*-Fragmenten in M13-Vektoren wurden am hiesigen Institut von I. Zauner (46) und J.

Rösch (47) durchgeführt. Dabei wurden außer definierten Restriktionsfragmenten auch eine Reihe kleinerer, durch *Ba131*-Verdauung gewonnener *FAS2*-Fragmente in M13-DNA eingebaut. Eine Serie solcher, sukzessive verkürzter Fragmente sollte eine kontinuierliche Sequenzierung des *FAS2*-Gens erleichtern.

In Tab.1 und Abb.14 sind, mit Ausnahme der *Ba131*-Fragmente (vgl. 3.3. und 3.4.), alle in dieser Arbeit isolierten *FAS2*-Subklone aufgeführt. Man sieht, daß insgesamt zehn verschiedene *FAS2*-Fragmente mit Größen zwischen 1.66 und 12.4 kb subkloniert wurden. Sieben der zehn Fragmente wurden dabei in beiden Orientierungen, drei in jeweils nur einer Orientierung in die Hefe-/*E.coli*-"shuttle"Vektoren pMS 201 bzw. pMS 202 eingebaut. Zwei der zehn Fragmente wurden außerdem auch noch in die M13-Vektoren mp11 bzw. mp18 in beiden Orientierungen eingebaut und so direkt einer Sequenzierung zugänglich gemacht.

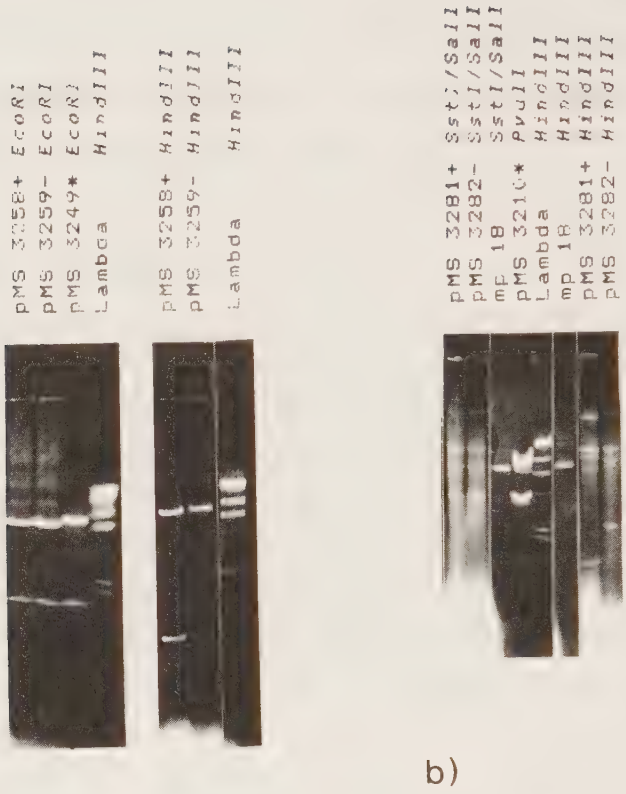


Abb.13: Restriktionsanalyse von *FAS2*-Subklonen nach Umklonierung aus pMS 3249 (a) bzw. pMS 3210 (b) in M13 mp11 bzw. M13 mp18

Je 1µg doppelsträngige Phagen-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und das Spaltmuster nach Agarose-Gelelektrophorese (0.8%) und Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Als Vergleich dienten jeweils die ursprünglichen *FAS2*-Klone mit dem entsprechenden klonierten Fragment (*).
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

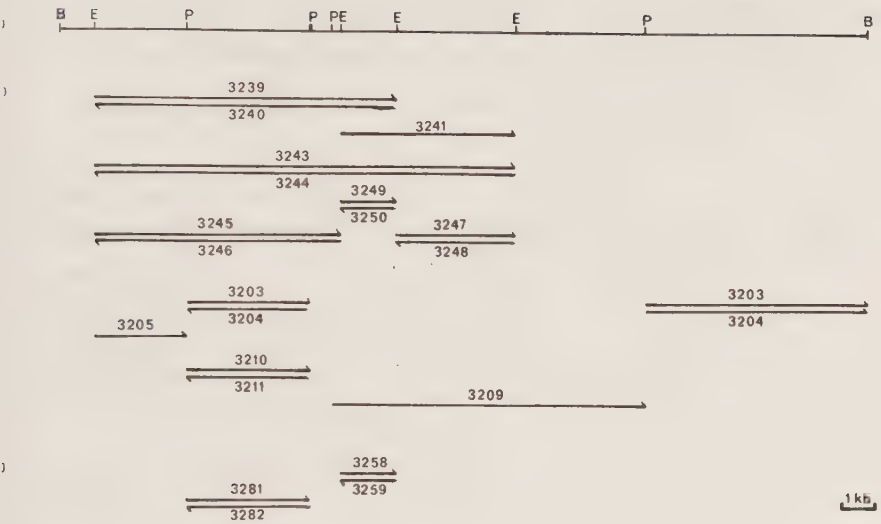


Abb.14: In dieser Arbeit subklonierte *FAS2*-Fragmente und ihre Orientierung im jeweiligen Vektor

Die Zahlen stellen die Bezeichnung der pMS-Plasmide dar und stimmen mit Tab.1 überein. Die Pfeilrichtung gibt die Orientierung der Fragmente im jeweiligen Vektor relativ zu pMS 2583 an (vgl. Seite 68).

(a) Restriktionskarte der im *FAS2*-Klon pMS 2583 enthaltenen Hefe-DNA (41).
(B=*BamHI*, E=*EcoRI*, P=*PvuII*)

(b) Subklonierte *FAS2*-Fragmente in den Hefe/*E.coli*-Vektoren pMS 201 bzw. pMS 202.

(c) Subklonierte *FAS2*-Fragmente in den Vektoren M13 mp18 bzw. M13 mp18.

Näheres siehe Text und Tab.1.

Tab. 1: Subklonierte Restriktionsfragmente aus dem Bereich des *FAS2*-Gens

Alle hier angegebenen Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit konstruiert. Die chromosomale Position der subklonierten *FAS2*-Fragmente ist der Abb.14 zu entnehmen. Die Fragmente sind entsprechend ihrer Größe nummeriert.

Plasmid	klonierte pMS 2583-Fragment	Fragment-Größe (kb)	Vektor	Orientierung des klon. Fragm. im Vektor
pMS 3203	*PvuII* #4 und #1	3.63 und 6.7	pMS 201	+
pMS 3204	*PvuII* #4 und #1	3.63 und 6.7	pMS 201	-
pMS 3205	*PvuII* #3	6.7	pMS 201	+
pMS 3209	*PvuII* #2	9.2	pMS 201	+
pMS 3210	*PvuII* #4	3.63	pMS 201	+
pMS 3211	*PvuII* #4	3.63	pMS 201	-
pMS 3239	*EcoRI* #2 und #5	7.28 und 1.6	pMS 202	+
pMS 3240	*EcoRI* #2 und #5	7.28 und 1.66	pMS 202	-

Tab.1: (Fortsetzung)

Plasmid	klooniertes pMS 2583-Fragment	Fragment-Größe	Vektor	Orientierung des klon. Frags. im Vektor
		(kb)		
pMS 3241	*EcoRI* #5 und #4	1.66 und 3.5	pMS 202	+
pMS 3243	*EcoRI* #2,#5 und #4	7.28,1.66 3.5	pMS 202	+
pMS 3244	*EcoRI* #2,#5 und #4	7.28,1.66 3.5	pMS 202	-
pMS 3245	*EcoRI* #2	7.28	pMS 202	+
pMS 3246	*EcoRI* #2	7.28	pMS 202	-
pMS 3247	*EcoRI* #4	3.5	pMS 202	+
pMS 3248	*EcoRI* #4	3.5	pMS 202	-
pMS 3249	*EcoRI* #5	1.66	pMS 202	+
pMS 3250	*EcoRI* #5	1.66	pMS 202	-
pMS 3258	*EcoRI* #5	1.66	M13 mp11	+
pMS 3259	*EcoRI* #5	1.66	M13 mp11	-
pMS 3281	*PvuII* #4	3.63	M13 mp18	+
pMS 3282	*PvuII* #4	3.63	M13 mp18	-

3.3. Konstruktion des Plasmids pMS 3276 und Charakterisierung der daraus hergestellten *Bal31*-Deletionsplasmide

Die ungefähre Lage des *FAS2*-Gens innerhalb des Plasmides pMS 2583 war durch Hybridisierung von Fragmenten desselben mit *FAS2*-mRNA ermittelt worden (40). Nach den geschilderten Subklonierungsexperimenten wurden die dabei erhaltenen und in Abb.14 aufgeführten subklonierten *FAS2*-Fragmente zur Transformation von *fas2*-Mutanten unterschiedlicher Komplementationsgruppen benutzt. Die Ergebnisse dieser Transformationsversuche stimmen hinsichtlich der Ausdehnung des *FAS2*-Gens auf der pMS 2583-DNA mit den durch "Northern"-Hybridisierung erhaltenen Daten überein (vgl. Abb.2). Um die Reihenfolge der drei *FAS2*-Domänen und ihre jeweilige Größe zu bestimmen, sollte eine Serie von Plasmiden hergestellt werden, in denen die *FAS2*-DNA sukzessive durch die Exonuklease *Bal31* verkürzt worden war. Dabei sollte von einem Plasmid ausgegangen werden, das bereits kleiner als pMS 2583 ist, aber dennoch das gesamte *FAS2*-Gen enthält. Außerdem sollte das betreffende Plasmid durch eine Restriktionsendonuklease möglichst nur ein einziges Mal, und zwar am Anfang oder Ende des *FAS2*-Gens, geschnitten werden. Da die Plasmide pMS 3243 bzw. pMS 3244 (vgl. Abb.14) bei der Transformation von *fas2*-Mutanten (siehe 3.5.) keine Transformationsraten zeigten, die auf Grund ihrer Höhe die Anwesenheit eines intakten *FAS2*-Gens in den Plasmiden erwarten ließen (vgl. Tab.3), war es notwendig, zunächst ein derartiges, das vollständige *FAS2*-Gen-enthaltendes Plasmid zu konstruieren. Dieses Plasmid sollte sich von pMS 2583 unter

Eliminierung des 6.9 kb großen *SphI*-Fragmentes im "rechten" Teil der in pMS 2583 klonierten Hefe-DNA ableiten (siehe Abb.2). Auf diesem Fragment wurde auf Grund der erwähnten Transformations- und "Northern"-Hybridisationsdaten keine *FAS2*-DNA mehr erwartet. Es wurde daher pMS 2583 partiell mit *SphI* verdaut und dazu zunächst eine Verdauungs-Kinetik mit steigenden Mengen Enzym erstellt. Wie Abb.15 zeigt, wurden 3µg Plasmid-DNA mit 4U *SphI* in 15 min total gespalten, während mit weniger Enzym die Verdauung in zunehmendem Maße unvollständig bleibt. Als Partialhydrolysat erschien der Ansatz am geeignetsten, bei dem die DNA 15 min mit nur 0.12U *SphI* inkubiert worden war (Bahn 6 in Abb.15). 0.5µg dieser partiell *SphI*-gespaltenen DNA wurden nach Inaktivierung des Enzyms religiert und mit ihnen *E.coli*-Zellen transformiert. Die Plasmide der dabei entstehenden Einzelkolonien wurden durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Unter 24 geprüften Plasmiden zeigten die meisten entweder dasselbe Restriktionsmuster wie das Ausgangsplasmid pMS 2583 oder aber sie hatten mehrere *SphI*-Fragmente gleichzeitig verloren. Lediglich das Plasmid pMS 3276 hatte nur das 6.9 kb große *SphI*-Fragment verloren. In Abb.16 ist das Restriktionsmuster und in Abb.19(a) die Restriktionskarte von pMS 3276 zu sehen.

Im nächsten Schritt sollte aus pMS 3276 durch Behandlung mit *Bal31*-Exonuklease eine Serie von Plasmiden konstruiert werden, in denen die *FAS2*-DNA gegenüber pMS 3276 in zunehmendem Maße polar verkürzt war. Zu diesem Zweck mußte das Plasmid zunächst mit einer nur einmal schneidenden Restriktionsendonuklease - möglichst am Anfang oder Ende der inserierten Hefe-DNA - linearisiert werden.

Wie aus Abb.2 und Abb.19 hervorgeht, schneidet das Enzym *XhoI* im Plasmid pMS 3276 nur ein einziges Mal, und zwar ganz "links", in der inserierten Hefe-DNA. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend über unterschiedliche Zeitintervalle mit *Bal31* verdaut (Abb.17). Die DNA-Moleküle des während einer Minute mit 1.2U *Bal31* inkubierten Ansatzes wurden nach Inaktivierung der Exonuklease (siehe MATERIAL UND METHODEN, 2.15.2.) religiert. Mit dem Ligationsgemisch wurden *E.coli*-Zellen transformiert und die Transformanten auf Ampicillin-Agar selektioniert. Auf den Antibiotika-Platten konnten nur Klone mit noch intaktem Ampicillin-Resistenzgen wachsen. Auf diese Weise wurden Plasmide ausgesondert, in denen die Vektor-DNA zu sehr verkürzt worden war. Da das Ampicillin-Resistenzgen im Vektor - von der *XhoI*-Schnittstelle aus gesehen - vor der *TRP1/ARS1*-Sequenz liegt, war somit auch gewährleistet, daß die Ampicillin-resistenten Plasmide noch für die Hefetransformation zu verwenden waren. Die aus einer Reihe von Einzelklonen isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalyse charakterisiert und dabei das Ausmaß der entstandenen Deletionen festgestellt. Durch Verwendung einer ausreichend großen Zahl verschiedener Restriktionsenzyme (*PvuII, XbaI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI und SphI*) wurde versucht, dabei eine möglichst gute Auflösung zu erreichen.

In Abb.18 sind die Restriktionsmuster und in Abb.19 die Restriktionskartierung einer Auswahl der so analysierten Plasmide zusammengestellt. Man sieht, daß in den einzelnen Plasmiden bestimmte Restriktionsfragmente entweder noch vorhanden oder durch neue ersetzt sind. Insgesamt wurden 28 verschiedene Plasmide isoliert, von denen jedoch einige hinsichtlich der Größe der in sie

inserierten Hefe-DNA fast gleich groß sind. In Abb.19 sind daher nur 11 verschiedene Plasmide jeweils mit den Grenzen der durch *Ba131* erzeugten Deletionen gezeigt. Es handelt sich dabei um diejenigen Plasmid-DNAs, die später für die Transformation von *fas2*-Mutanten verwendet wurden (siehe 3.5.).

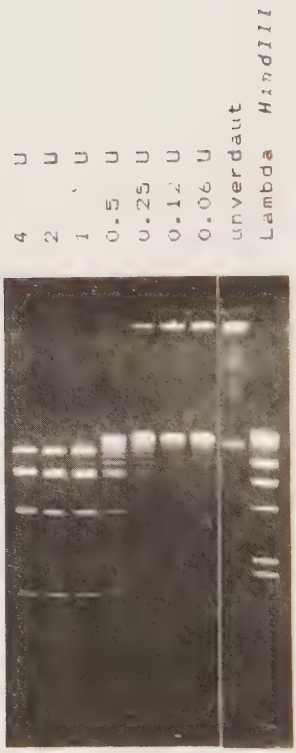


Abb.15: Partielle *SphI*-Spaltung von pMS 2583

In verschiedenen Ansätzen wurden jeweils 3µg pMS 2583-DNA in einem Volumen von 10µl mit der angegebenen Menge *SphI* 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch 10min Erhitzen auf 65°C inaktiviert und von den verschiedenen Ansätzen jeweils 3.5µl auf ein Agarose-Gel(0.7%) aufgetragen und elektrophoresiert. Das Spaltmuster wurde nach Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

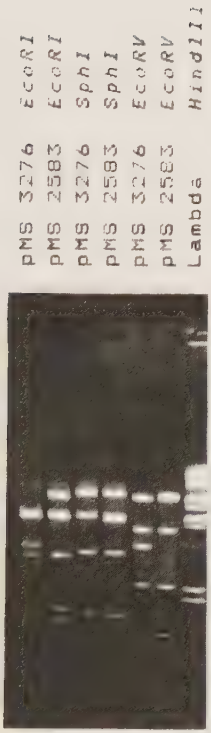


Abb.16: Restriktionsanalyse des *FAS2*-Klons pMS 3276

Je 1µg Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 10µl wie angegeben gespalten und das Spaltmuster nach Agarose-Gelelektrophorese (0.8%) und Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Analoge Restriktionsdaten des Ausgangsklons pMS 2583 sind als Kontrolle mit aufgeführt.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

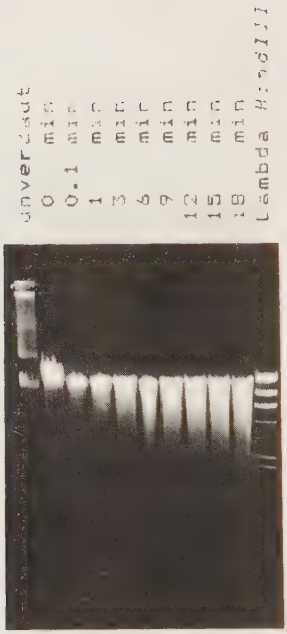


Abb.17: Verkürzung von linearisierter pMS 3276-DNA mit *Bal31*-Exonuklease

In einem Gesamtvolumen von 300µl wurden 50µg mit *XhoI* linearisierte pMS 3276-DNA (Bahn 2) mit 1.2U *Bal31* bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden dem Ansatz 40µl-Proben entnommen und nach Inaktivierung des Enzyms jeweils 7µl davon auf ein 0.6% Agarose-Gel aufgetragen. Nach Elektrophorese und Etbr-Färbung wurde die Kinetik unter UV-Beleuchtung photographiert. Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

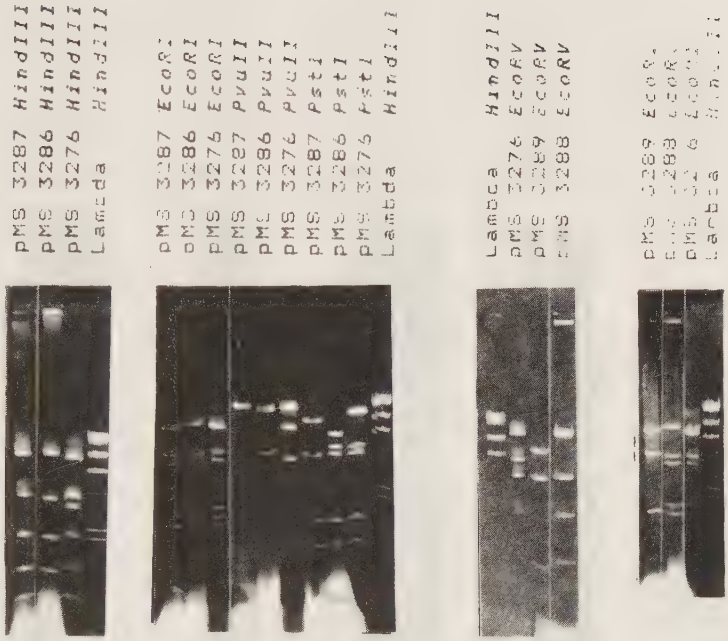


Abb.18: Restriktionsanalyse einiger der durch *Bal31*-Abbau aus pMS 3276 erhaltenen Deletionsplasmide

Je 1µg Plasmid-DNA der verschiedenen *FAS2*-Deletionsplasmide (vgl.Abb.19) wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, das Spaltgemisch elektrophoretisch aufgetrennt und nach Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

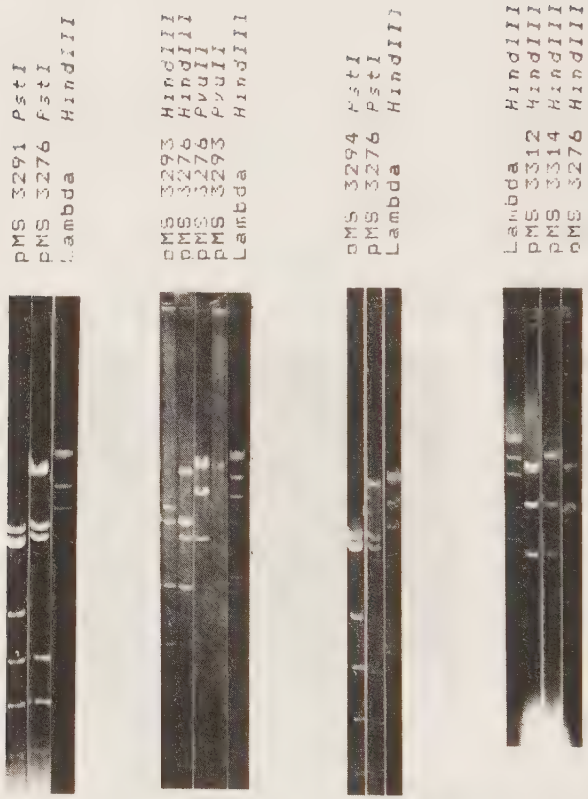


Abb.18: (Fortsetzung)

Restriktionsanalyse einiger der durch *Bal31*-Abbau aus pMS 3276 erhaltenen Deletionsplasmide

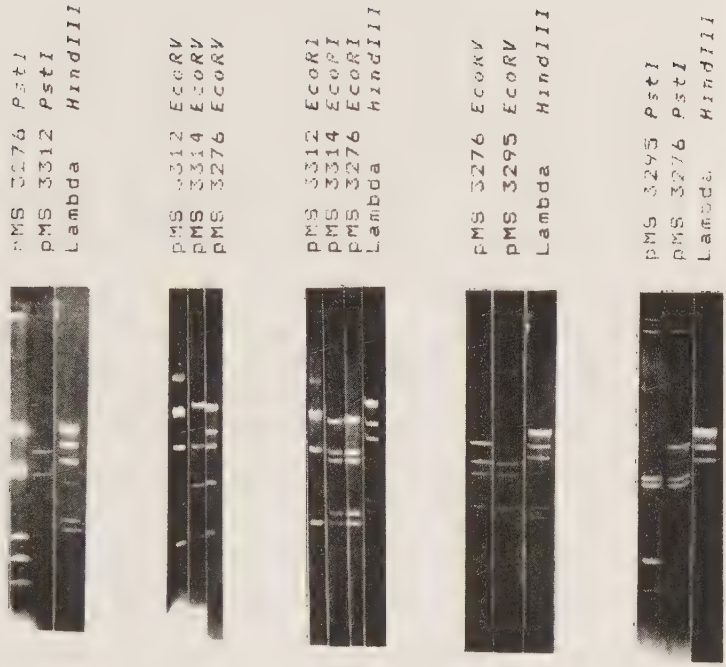


Abb.18: (Fortsetzung)

Restriktionsmuster einiger der durch *Bal31*-Abbau aus pMS 3276 erhaltenen Deletionsplasmide

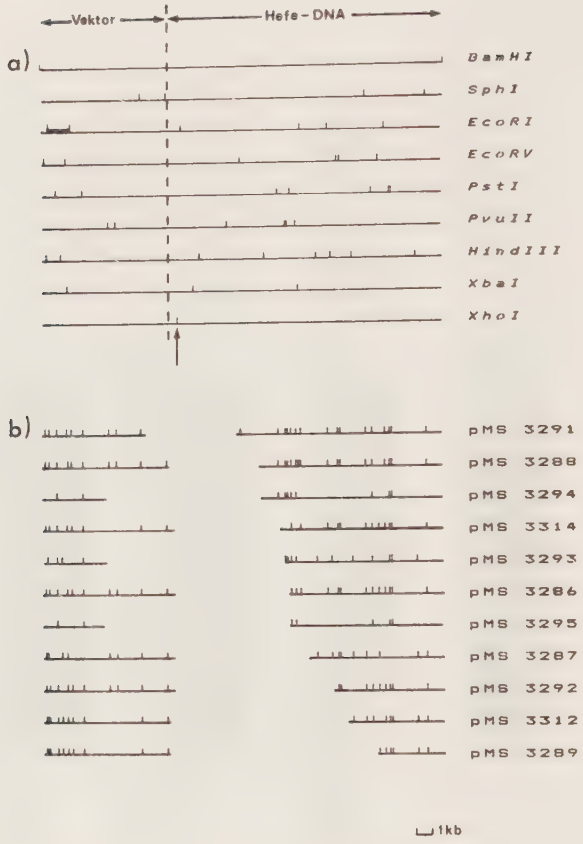


Abb.19: Restriktionskartierung der aus pMS 3276 abgeleiteten *Ba131*-Deletionsplasmide (vgl. Abb.18)

(a) Restriktionskarte des Ausgangsklons pMS 3276. Das *TRP1/ARS1*-haltige *EcoRI*-Fragment des Vektors ist dick gezeichnet.
(b) Ausgehend von der mit einem Pfeil markierten *XhoI*-Schnittstelle in pMS 3276, ist das Ausmaß der durch *Ba131* erzeugten Deletionen dargestellt. Die Restriktionskartierung der einzelnen Plasmide basiert auf den in Abb.18 dargestellten Daten. Nur die hierbei ermittelten Restriktions-Schnittstellen sind in die einzelnen Plasmide eingetragen.

3.4. Sukzessive Verkürzung von pMS 3291 mit *Ba131*-Exonuklease

Das Plasmid pMS 3291 war durch partiellen *Ba131*-Abbau aus dem Plasmid pMS 3276 hergestellt worden (vgl. Abb.19). Ebenso wie pMS 2583 und pMS 3276 war auch pMS 3291 in der Lage, alle von uns untersuchten *fas2*-Mutanten (Komplementationsgruppen IV, VI, VII und VIII) hinsichtlich ihres *fas2*-Phänotyps zu revertieren (vgl. Tab.3). Man konnte deshalb davon ausgehen, daß dieses Plasmid das gesamte *FAS2*-Gen enthält. Da die in pMS 3291 klonierte Hefe-DNA eine Länge von ca. 13 kb hat (vgl. Abb.19), das *FAS2*-Gen jedoch nur ca. 7 kb groß ist, sollte versucht werden, durch kontrollierte Verkürzung die vermutete überschüssige und nicht zum *FAS2*-Bereich gehörende DNA aus pMS 3291 zu entfernen. Hierzu wurde die pMS 3291-DNA erneut durch *Ba131*-Exonuklease, diesmal jedoch von der anderen Seite her, verkürzt. Nach den Ergebnissen der "Northern"-Hybridisierung (40) von poly(A)-RNA mit *FAS2*-Restriktionsfragmenten müßte pMS 3291 "rechts" vom *FAS2*-Gen ca. 4 kb überschüssige DNA kloniert enthalten.

Bei der geplanten *Ba131*-Verdauung sollte ein Plasmid konstruiert werden, dessen inserierte Hefe-DNA kürzer ist als in pMS 3291, aber trotzdem noch das gesamte *FAS2*-Gen enthält. Ein solches Plasmid sollte - anders als alle bisher verfügbaren *FAS2*-Plasmide (pMS 2583, pMS 3276, pMS 3291) - *fas2*-Mutanten nicht nur unabhängig von ihrer Komplementationsgruppenzugehörigkeit, sondern auch mit einer hohen Rate transformieren. Dies war im Falle der *fas1*-Mutanten z.B.

mit dem *FAS1*-Plasmid pMS 3021 gelungen. Die bisher unbefriedigenden Transformationsraten der oben genannten *FAS2*-Plasmide könnten mit ihrer Größe zusammenhängen. Daher wurde erwartet, daß bei weiterer Verkürzung unter Beibehaltung des *FAS2*-kodierenden Bereichs eine Verbesserung der Transformationseigenschaften zu erreichen sein könnte. Im weiteren Verlauf könnte ein solches Plasmid - bei zunehmender Verkürzung von einem seiner Enden her - als Ausgangspunkt für die Bestimmung der Domänenreihenfolge innerhalb des *FAS2*-Gens dienen und dabei die mit den bereits vorhandenen *FAS2*-Subklonen erhältlichen Daten ergänzen.

Für eine *Bal31*-Verkürzung der in pMS 3291 inserierten Hefe-DNA mußte das Plasmid zunächst mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert werden. Dieses Enzym sollte seine, einzige, Schnittstelle möglichst an der Grenze zwischen inserierter Hefe-DNA und Vektor (vgl. Abb.19) haben. In pMS 3291 ist nur noch eine einzige *BamHI*-Schnittstelle vorhanden, und zwar am Ende der klonierten Hefe-DNA (vgl. Abb. 19). Das Plasmid pMS 3291 wurde daher mit *BamHI* aufgeschnitten und anschließend mit *Bal31* verdaut (nicht gezeigt). Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen, das Enzym jeweils inaktiviert, die verkürzten DNA-Moleküle religiert und mit ihnen *E.coli RR1*-Zellen transformiert. Die Plasmid-DNA einer Reihe von dabei erhaltenen Einzelklonen wurde nach der Miniscreen-Methode isoliert und zunächst mit *EcoRI* gespalten und die Spaltgemische gelelektrophoretisch untersucht (vgl. Abb.21). Für weitere Restriktionsanalysen waren nur solche Plasmide interessant, die das 1.45 kb *TRP1/ARS1 EcoRI*-Fragment der Vektor-DNA noch

enthielten. Plasmide, welche durch die *Bal31*-Behandlung diese für die autonome Plasmid-Replikation in Hefe notwendige Sequenz verloren hatten, waren für die geplante Transformation von *trp1/fas2*-Doppelmutanten unbrauchbar und wurden nicht näher analysiert.

Bei der Verkürzung von pMS 3291 durch *Bal31* von der in Abb.20 mit Pfeil markierten *BamHI*-Schnittstelle aus wurden auf diese Weise neun verschiedene Plasmide isoliert, deren physikalische Restriktionskarten in Abb.20 dargestellt sind. Der Vektoranteil dieser Plasmide ist nicht mehr gezeigt, da er gegenüber pMS 3291 höchstens um 374 bp - das ist der Abstand zwischen der *BamHI*- und der ersten *EcoRI*-Schnittstelle (vgl. Abb.19a) - verkürzt ist.

Die Restriktionsmuster aller in Abb.20 aufgeführten Plasmide sind in Abb.21 zusammengefaßt. Eine zusammenfassende Darstellung der in Abb.19 und Abb.20 enthaltenen *FAS2*-Subklone ist in Abb.23 wiedergegeben.

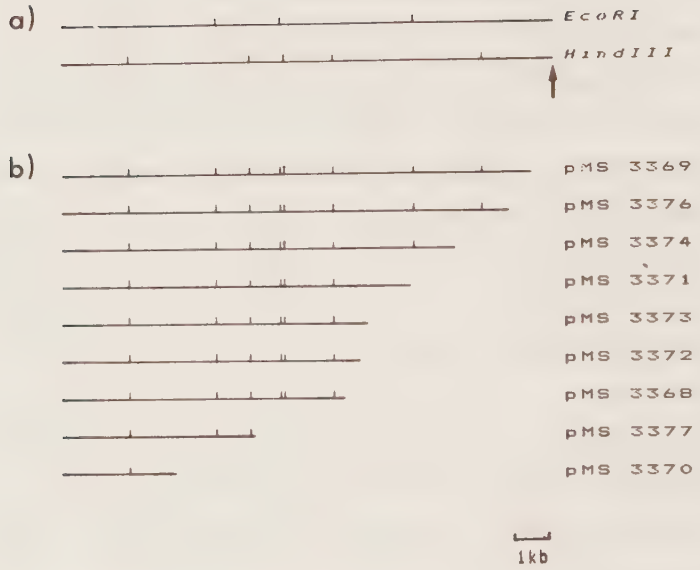


Abb.20: *EcoRI/HindIII*-Restriktionskarte (ohne Vektor) der aus pMS 3291 durch *Bal31*-Verdauung entstandenen Plasmide (Daten aus Abb.21)

Die Karte (b) gibt das Ausmaß der, ausgehend von der mit einem Pfeil markierten *BamHI*-Schnittstelle, durch *Bal31* in pMS 3291 erzeugten Deletionen in Relation zur Restriktionskarte der Ausgangs-DNA (a) an. Es ist jeweils nur die klonierte Hefe-DNA gezeichnet, da der Vektoranteil gegenüber pMS 3291 (s. Abb.21) höchstens um 374 bp kleiner werden durfte (s. Text).

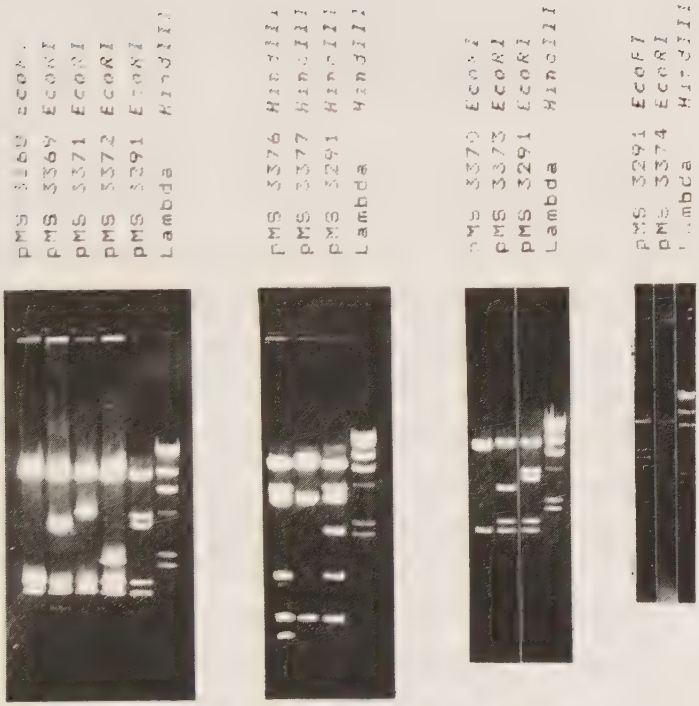


Abb.21: Restriktionsmuster der durch *Bal31*-Verdauung von pMS 3291 gewonnenen Deletionsplasmide

Je 1µg Plasmid-DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. Die Spaltmuster wurden auf einem 0,8% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach Etbr-Färbung unter UV-Beleuchtung photographiert. Als Vergleich diente jeweils das Ausgangsplasmid pMS 3291.
Längen-Standard: Lambda-DNA, *HindIII*-gespalten.
Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

3.5. Transformation von biochemisch definierten *fas2*-Mutanten mit subklonierten *FAS2*-DNA Restriktionsfragmenten

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene Fragmente des *FAS2*-Gens zur Bestimmung der Domänenreihenfolge im *FAS2*-Gen subkloniert worden waren, sollten im zweiten Teil mit diesen Subklonen ausgewählte und hinsichtlich ihres Enzymdefektes definierte Mutanten aller *FAS2*-Komplementationsgruppen transformiert werden. *Saccharomyces cerevisiae fas2*-Mutanten lassen sich im wesentlichen vier verschiedenen Komplementationsgruppen zuordnen:

- Gruppe IV : pleiotrop, keine interallele Komplementation; alle Teilenzyme defekt
- Gruppe VI : ß-Ketoacylsynthase-defekt
- Gruppe VII : Acyl-Carrier-Protein-defekt
- Gruppe VIII : ß-Ketoacylreduktase-defekt

Die Zugehörigkeit der in dieser Arbeit verwendeten *fas2*-Mutanten zu den genannten Komplementationsgruppen war auf Grund früherer Untersuchungen am hiesigen Institut (48) bekannt. Grundsätzlich komplementieren alle *fas1*-Mutanten alle *fas2*-Mutanten zum *FAS*-prototrophen Phänotyp (i n t e r gene Komplementation), während i n t r a gene Komplementation nur zwischen nicht-pleiotropen, allelen *fas*-Mutanten verschiedener Gruppenzugehörigkeit beobachtet wird. Pleiotrope Mutanten sind dadurch definiert, daß sie nur zur intergenen, nicht jedoch zur intragenen Komplementation fähig sind.

Zur Optimierung der Transformationsbedingungen waren bereits vor Beginn der Arbeit stabile, d.h. praktisch reversionsfreie *fas2*-Mutanten aller Komplementationsgruppen unter gleichzeitigem Einkreuzen des *trp1*-Markers in *fas2/trp1*-Doppelmutanten umgewandelt worden (E. Höllerer, B. Hoffmann, unveröffentlichte Ergebnisse). Alle zur Transformation benutzten Plasmide enthielten zusätzlich zu der subklonierten *FAS2*-DNA noch das *TRP1/ARS1*-Hetereplikon, was eine vorgeschaltete Selektion Plasmid-haltiger Hefezellen auf *TRP*-freiem Nährmedium möglich machte. Diese Eigenschaft war grundsätzlich unabhängig davon, ob die Zellen gleichzeitig auch zur *FAS*-Prototrophie transformiert worden waren.

Bei der Transformation von *fas1*-Mutanten durch klonierte *FAS1*-DNA, die in früheren Arbeiten an diesem Institut von L. Roberts (9), L. Seidler (49) und E. Höllerer (10) durchgeführt worden war, war aufgefallen, daß nur wenige *FAS*-Plasmide zu hohen Transformantenzahlen, d.h. zu gut meßbaren Transformationsraten führten, obwohl die Fähigkeit zur Selbstreplikation in Hefe allen Plasmiden gemeinsam war (*ARS*-haltiger Vektor). Der Grund für die niedrigen, sonst nur bei nicht autonom replizierenden Plasmiden (50) beobachtete Transformationsraten liegt in diesen Fällen wahrscheinlich darin, daß die betreffenden Klone nicht das intakte, sondern nur T e i l e des *FAS1*-Gens enthielten. In diesem Fall findet eine Restitution des *FAS1*-prototrophen Charakters der Zelle nur nach Rekombination zwischen chromosomaler DNA und Plasmid-DNA statt (Plasmid-Integration oder Genkonversion) (51). Demgegenüber können Plasmide, die das gesamte Gen enthalten, alle *fas1*-Mutanten

komplementieren, ohne dafür ins Chromosom eingebaut werden zu müssen. So führte z.B. der *FAS1*-Subklon pMS 3021, welcher das ganze *FAS1*-Gen der Hefe enthielt, zu Transformationsraten von 10^{-3} bis 10^{-4} Transformanten pro regenerierter Zelle. Diese Rate ist in ihrer Höhe typisch für komplementierende, extrachromosomale Elemente (51). Andere *FAS1*-Subklone transformierten - wenn überhaupt - nur mit der wesentlich niedrigeren Rate von 10^{-6} bis 10^{-7} Transformanten pro regenerierter Zelle.

Die intragene Kartierung der drei verschiedenen *FAS2*-Domänen wurde daher nicht mittels direkter Selektion von *FAS*-Prototrophen durchgeführt. Vielmehr wurden - wie bereits oben erwähnt - zunächst alle nicht-transformierten Zellen durch Selektion *TRP1*-Prototropher auf *TRP*-freiem Medium eliminiert und anschließend unter der Gesamtzahl Plasmid-haltiger, *TRP*-positiver Zellen der Anteil *FAS2*-Prototropher ermittelt. Unter selektivem Druck, d.h. Tryptophan-Mangel, sind die *ARS1/TRP1*-haltigen Plasmide in der Hefezelle stabil, wodurch eine Rekombination zwischen Plasmid-DNA und chromosomaler DNA begünstigt wird und die experimentell feststellbaren Transformationsraten erhöht werden.

Die günstigsten experimentellen Bedingungen für die Durchführung gut auswertbarer Transformationsversuche waren bereits von anderen Mitarbeitern dieses Instituts ermittelt worden. Deshalb war es nicht mehr notwendig, diese in langwierigen Vorversuchen zu erarbeiten. Somit konnten die in Tab.2 aufgeführten Vertreter der vier verschiedenen *FAS2*-Komplementationsgruppen mit den im ersten Teil dieser Arbeit konstruierten *FAS2*-Subklonen

transformiert werden.

Die dabei erhaltenen Daten sind in Tab.3 zusammengefaßt. Ihre Auswertung erfolgte in Abb.22 (a) und (b), wobei jede durch einen bestimmten Subklon transformierte *fas2*-Mutante durch Angabe ihrer Komplementationsgruppen-Zugehörigkeit auf dem entsprechenden Genabschnitt vermerkt ist (Abb.22a). Umgekehrt geht aus Abb.22 (b) hervor, in wievielen Fällen die einzelnen Subklone n i c h t in der Lage waren, den Vertreter einer bestimmten Komplementationsgruppe zu transformieren. Wie man sieht, lassen sich die experimentellen Daten ohne Ausnahme auf die in Abb.23 wiedergegebene Weise zusammenfassen. Danach stellen die drei katalytischen *FAS2*-Domänen definierte, umgrenzte Abschnitte dieses "Cluster"-Gens dar. Ihre Reihenfolge innerhalb des Gens ist: ß-Ketoacylreduktase, ß-Ketoacylsynthase und Acyl-Carrier-Protein. Da die *FAS2*-Transkriptionsrichtung noch nicht bekannt ist, läßt sich noch keine Aussage über das Amino- bzw. Carboxyl-Ende des Proteins machen.

Tab. 2: Für die Transformation verwendete *fas2*/*trp1*-Doppelmutanten

Alle in dieser Arbeit für Transformationsversuche verwendeten Mutanten sind - nach Komplementationsgruppen geordnet - hier aufgeführt.

Komplementations-gruppe	*fas2*-Mutante Nr.	x	*trp1*-Mutante Nr.
IV	152		SC 215
IV	219		SC 6011
IV	392		SC 6011
IV	1098		SC 215
IV	1368		SC 215
IV	1910		SC 215
VI	7		SC 215
VI	15		SC 215
VI	46		SC 215
VI	75		SC 215
VI	117		SC 215
VI	446		SC 215
VI	1230		SC 6011
VI	1373		SC 6011
VI	229		SC 215
VII	145		SC 215
VII	372		SC 215
VII	462		SC 215
VII	463		SC 215
VIII	38		SC 215
VIII	159		SC 215
VIII	775		SC 6011
VIII	1330		SC 215

Tab. 3: Transformation von *fas2/trp1*-Doppelmutanten mit klonierten *FAS2*-DNA-Fragmenten

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden. Die Sphäroplastierunsrate war in allen Fällen >98%.
Bezüglich Stamm- und Plasmid-Bezeichnung vgl. Tab.1 und Tab.2 sowie Abb.14, 19 und 20.
Römische Zahlen in Klammern hinter den Mutantennummern geben die Komplementationsgruppe an.

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
152 (IV)	3291	18	155	3.4	65/65	100
	3276	2	48	0.6	48/48	100
	3371	18	183	4.1	75/75	100
	3368	18	1	0.02	1/1	100
	3373	18	46	1	42/42	100
	3241	2	66	0.9	56/56	100
	2583	2	40	0.5	38/40	95
	3295	34	55	0.3	47/52	90
	3209	34	321	1.9	95/107	88
	3268	34	104	0.6	80/95	84
	3287	34	6	0.04	4/6	67
	3247	2	40	0.5	16/29	55
	3372	18	6	0.1	3/6	50
	3273	34	113	0.7	32/84	38
	3274	34	15	0.09	2/10	20
	3292	34	7	0.04	1/7	14
	3289	34	20	0.1	0/20	0
	3240	34	1	0.01	0/1	0
	3312	34	1	0.01	0/1	0
	3249	2	10	0.1	0/10	0

ab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10⁴Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS⁺/TRP⁺*	%
219 (IV)	3276	69	127	0.6	30/30	100
	3294	23	63	0.9	52/52	100
	3209	17	13	0.4	8/8	100
	3245	69	2	0.01	2/2	100
	3291	16	212	30	110/111	99
	2583	69	29	0.1	22/23	96
	3314	23	63	0.9	46/48	96
	3286	23	542	7	96/108	88
	3295	38	6	0.03	5/6	83
	3293	23	6	0.08	4/6	67
	3240	69	3	0.01	2/3	67
	3241	17	31	1	18/31	58
	3249	69	139	0.7	3/46	7
	3292	38	35	0.2	0/34	0
	3247	23	83	1.1	0/48	0
	3289	38	440	1.9	0/80	0
	3370	16	1316	188	0/80	0
	3210	17	4	0.1	0/4	0
	3268	17	67	2.2	0/48	0
	3271	22	115	0.5	0/80	0
	3274	22	78	0.3	0/78	0
392 (IV)	3291	10	22	0.2	22/22	100
	3371	0.8	628	449	108/108	100
	3288	1.1	512	284	84/84	100
	3376	10	30	0.2	30/30	100
	3373	10	114	0.8	91/91	100
	3314	1.1	387	215	73/73	100
	3286	1.1	796	442	66/66	100
	3293	1.1	127	71	76/76	100

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
392 (IV)	3294	10	1	0.01	1/1	100
	3374	0.8	275	196	102/102	100
	3369	10	251	1.7	128/128	100
	3295	1.1	337	187	72/75	96
	3292	1.1	392	217	81/89	91
	3287	1.1	44	24	37/43	86
	3209	18	29	1.5	25/29	86
	3372	0.8	78	56	43/66	65
	3368	10	19	0.1	11/19	58
	3276	18	7	0.4	4/7	57
	2583	18	3	0.2	1/2	50
	3268	10	22	0.2	5/11	45
	3370	0.8	287	205	0/109	0
	3273	10	482	3.3	0/121	0
	3377	10	64	0.4	0/51	0
	3210	18	67	3.4	0/66	0
1098 (IV)	3291	98	5	0.3	5/5	100
	3371	3	25	11	25/25	100
	3244	2	23	5	21/21	100
	3368	3	6	3	6/6	100
	3372	3	1	0.4	1/1	100
	3292	3	10	5	10/10	100
	3209	2	69	14	45/46	98
	3276	2	131	26	85/87	98
	2583	2	126	25	76/78	97
	3369	3	27	12	26/27	96
	3247	2	134	27	91/96	95
	3241	2	82	16	60/68	88
	3374	3	40	17	32/40	80

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
1098 (IV)	3312	3	6	3	4/5	80
	3271	11	5	0.7	4/5	80
	3274	11	5	0.7	4/5	80
	3245	2	32	6	22/32	69
	3287	3	11	0.5	7/11	64
	3239	2	14	3	9/14	64
	3377	11	11	2	4/11	36
	3249	2	11	2	4/11	36
	3268	11	57	8	0/13	0
	3289	11	3	0.4	0/3	0
	3370	11	8	1	0/8	0
1368 (IV)	3291	15	229	2.7	125/125	100
	3371	18	109	47	109/109	100
	3276	5	186	9	96/96	100
	2583	5	490	25	88/88	100
	3244	5	160	8	92/92	100
	3292	18	225	98	120/120	100
	3287	18	77	33	53/53	100
	3295	18	66	29	48/48	100
	3312	18	17	7.4	17/17	100
	3209	5	435	22	93/93	100
	3241	5	295	15	102/102	100
	3247	5	377	19	101/101	100
	3273	18	21	9	19/21	90
	3289	18	3	1.3	0/3	0
	3377	18	1	0.4	0/1	0
	3240	5	1	0.05	0/1	0

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
1910 (IV)	3374	21	1	0.09	1/1	100
	3294	21	3	0.3	3/3	100
	3276	12	27	3.5	21/27	78
	2583	12	25	3.2	18/25	72
	3292	21	8	0.7	5/8	63
	3209	12	12	1.6	5/12	42
	3373	21	57	5	5/26	19
	3287	21	6	0.5	1/6	17
	3312	21	6	0.5	0/5	0
	3377	21	40	3.5	0/31	0
	3370	21	108	9.6	0/30	0
	3210	12	11	1.4	0/1	0
7 (VI)	3371	14	54	1.2	48/48	100
	3374	14	1696	38	105/105	100
	3241	6	40	3.3	39/39	100
	3244	6	156	13	91/92	99
	3376	14	590	13	101/103	98
	3276	26	168	0.6	105/107	98
	3291	14	268	6	94/96	98
	3295	26	174	0.7	106/108	98
	3293	26	569	2.2	11/114	97
	3286	26	800	3.1	111/116	96
	2583	6	77	6	40/42	95
	3247	26	786	3	105/114	92
	3287	26	238	0.9	92/100	92
	3372	14	220	5	52/57	91
	3209	14	3000	68	58/85	68
	3292	14	1600	36	74/117	63

ab. 3: (Fortsetzung)

Fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
7 (VI)	3268	14	92	2	33/73	45
	3246	26	37	0.1	0/36	0
	3312	14	555	13	0/103	0
	3368	14	7	0.2	0/7	0
	3377	14	6	0.1	0/6	0
	3370	14	1420	32	0/103	0
	3274	14	2344	53	0/62	0
	3271	14	5000	114	0/71	0
	3249	14	2500	57	0/102	0
15 (VI)	2583	86	206	2.6	52/52	100
	3276	40	339	3.3	115/115	100
	3291	1	840	280	160/160	100
	3369	53	47	0.3	25/25	100
	3293	53	5	0.03	5/5	100
	3294	1	146	49	84/84	100
	3244	86	269	3.4	93/93	100
	3247	86	615	8	81/81	100
	3287	40	35	0.4	33/33	100
	3241	86	655	8	92/93	99
	3268	86	475	6	53/67	79
	3209	86	233	2.9	81/110	74
	3292	40	297	2.9	51/83	61
	3312	40	9	0.09	0/9	0
	3289	40	1568	15	0/115	0
	3210	86	66	0.8	0/34	0
	3245	86	124	1.6	0/38	0
	3239	86	4	0.05	0/1	0
	3249	86	520	6.6	0/56	0
	3271	1	169	56	0/53	0

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
15 (VI)	3273	1	880	293	0/136	0
	3274	1	10	3.3	0/10	0
	3377	53	14	0.08	0/7	0
46 (VI)	3276	2	4	0.9	3/3	100
	3291	60	2	0.01	2/2	100
	3371	60	13	0.06	10/10	100
	3368	60	5	0.02	2/2	100
	3247	55	1504	12	50/50	100
	3287	2	2	0.5	2/2	100
	3294	2	2	0.5	1/1	100
	3295	58	7	0.1	7/7	100
	3369	60	51	0.2	36/38	95
	3209	55	237	1.9	88/95	93
	3241	55	66	0.5	57/62	92
	3244	90	156	1.2	83/91	91
	2583	55	30	0.2	23/29	79
	3268	90	233	1.8	67/104	64
	3372	60	11	0.05	7/11	64
	3292	90	120	0.9	0/108	0
	3312	90	15	0.1	0/12	0
	3289	90	136	1.1	0/115	0
	3280	90	405	3.1	0/79	0
	3210	55	37	0.3	0/34	0
	3239	55	5	0.04	0/3	0
	3249	55	776	6.2	0/103	0
	3273	2	204	46	0/121	0
	3274	2	4	0.9	0/4	0
75 (VI)	3276	17	90	1.3	83/83	100

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
75 (VI)	3291	43	185	1.9	76/76	100
	3371	43	131	1.3	89/89	100
	2583	22	66	1.5	66/66	100
	3244	17	147	2.1	125/125	100
	3287	17	21	0.3	20/20	100
	3292	17	37	0.5	31/32	97
	3209	17	241	3.4	114/119	96
	3268	17	258	3.7	116/126	92
	3241	17	14	0.2	10/11	91
	3295	17	9	0.1	8/9	89
	3247	22	410	9.1	41/48	85
	3294	22	6	0.07	5/6	83
	3372	43	44	0.4	35/44	80
	3368	43	311	3.1	62/83	75
	3289	17	68	1	0/57	0
	3280	17	417	6	0/95	0
	3273	17	269	3.8	0/134	0
	3210	22	24	0.5	0/22	0
	3245	22	113	2.5	0/52	0
	3239	22	34	0.8	0/34	0
	3274	22	1	0.01	0/1	0
117 (VI)	3291	43	191	4.8	110/110	100
	2583	43	133	8.7	102/102	100
	3276	43	32	2.1	32/32	100
	3371	43	54	1.4	54/54	100
	3288	63	315	6.8	114/114	100
	3241	43	19	1.2	19/19	100
	3209	43	45	2.9	45/45	100
	3374	43	42	1.1	35/35	100

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
117 (VI)	3373	43	25	0.6	17/17	100
	3286	43	9	0.2	9/9	100
	3295	0.2	13	43	13/13	100
	3292	0.2	2	7	2/2	100
	3376	43	110	2.8	52/53	98
	3293	0.2	19	63	17/19	89
	3369	43	43	1.1	28/43	65
	3268	0.2	2	7	1/2	50
	3247	0.2	5	17	2/5	40
	3372	43	5	0.1	2/5	40
	3249	0.2	3	10	0/3	0
	3271	43	28	0.7	0/28	0
	3377	43	12	0.3	0/12	0
	3274	43	4	0.1	0/4	0
	3210	43	6	0.4	0/6	0
	3289	63	102	2.2	0/54	0
	3312	63	84	1.8	0/84	0
	3368	63	43	0.9	0/43	0
446 (VI)	2583	10	94	6.3	52/52	100
	3276	10	115	7.7	99/99	100
	3291	26	58	1.5	58/58	100
	3294	26	11	0.3	11/11	100
	3244	10	40	2.7	40/40	100
	3241	10	358	24	104/104	100
	3292	2	1	0.07	1/1	100
	3287	2	21	1.5	21/21	100
	3295	2	19	1.4	17/17	100
	3209	26	4	0.1	3/3	100
	3293	2	84	6	83/84	100

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10⁴Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS⁺/TRP⁺*	%
446 (VI)	3247	10	360	24	108/110	99
	3268	55	18	0.3	2/18	11
	3289	2	1	0.07	0/1	0
	3210	10	20	1.3	0/15	0
	3249	10	256	17	0/100	0
	3271	10	780	52	0/74	0
	3274	26	12	0.3	0/9	0
	3280	28	196	1.8	0/78	0
	3368	28	166	1.6	0/73	0
	3372	28	13	0.1	0/13	0
	3312	28	116	1.1	0/54	0
1230 (VI)	3276	7	405	20	103/103	100
	3291	8	2388	77	117/117	100
	3371	8	2520	81	115/115	100
	3244	7	243	12	51/51	100
	3209	7	23	1.9	20/20	100
	3294	2	143	17	99/99	100
	2583	7	405	20	44/45	99
	3241	2	376	46	101/103	98
	3292	6	293	20	74/80	93
	3372	8	252	8.1	115/123	93
	3268	8	1170	38	88/96	92
	3287	2	45	5.5	28/37	76
	3368	8	429	14	79/119	66
	3280	6	234	16	0/90	0
	3312	8	26	0.8	0/25	0
	3289	2	43	5.2	0/27	0
1373 (VI)	3276	5	29	1	29/29	100

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
1373 (VI)	2583	5	357	12	109/109	100
	3241	5	768	26	99/99	100
	3209	0.2	32	36	31/32	97
	3244	5	133	4.6	62/66	94
	3247	5	1472	51	81/107	76
	3268	5	2224	77	77/102	75
	3287	3	44	4	11/44	25
	3292	3	1100	100	26/118	22
	3312	3	235	21	0/104	0
	3289	3	488	44	0/116	0
	3210	5	1576	54	0/55	0
	3245	5	1296	45	0/84	0
	3239	5	93	3.2	0/93	0
	3249	5	3088	106	0/116	0
	3271	5	3500	121	0/102	0
	3273	0.2	101	112	0/90	0
	3274	0.2	8	8.9	0/8	0
229 (VI)	3291	10	160	11	105/105	100
	3371	0.7	2	1.4	2/2	100
	3276	52	1	0.01	1/1	100
	3369	10	46	3.3	46/46	100
	3374	10	37	2.6	37/37	100
	3287	10	4	0.3	4/4	100
	3368	10	1	0.07	1/1	100
	3372	10	3	0.2	3/3	100
	3288	10	67	4.8	41/41	100
	3209	52	7	0.06	7/7	100
	3241	52	3	0.03	3/3	100
	3376	10	72	5.1	71/72	99

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
229 (VI)	3373	10	24	1.7	22/23	96
	3244	52	18	0.2	17/18	94
	3286	10	1282	91	93/99	93
	3293	10	38	2.7	24/37	65
	3268	10	65	4.6	0/58	0
	3292	10	78	5.5	0/78	0
	3312	10	1	0.07	0/1	0
	3377	10	1	0.07	0/1	0
	3274	10	8	0.6	0/8	0
	3289	10	750	53	0/58	0
	3210	52	3	0.03	0/3	0
145 (VII)	3291	0.2	159	80	92/92	100
	3276	16	29	0.3	29/29	100
	3371	0.2	623	312	89/89	100
	3374	0.2	1812	906	94/94	100
	3376	0.2	1644	822	97/97	100
	3292	16	63	0.7	60/60	100
	3287	16	34	0.4	34/34	100
	3209	63	149	1.2	98/99	98
	3295	16	55	0.6	49/50	98
	3241	63	74	0.6	72/74	97
	2583	63	48	0.4	29/31	94
	3247	63	40	0.3	34/40	85
	3273	0.2	2376	1188	38/91	42
	3268	16	50	0.6	0/43	0
	3280	16	106	1.2	0/80	0
	3289	16	107	1.3	0/105	0
	3368	0.2	46	23	0/35	0
	3372	0.2	1032	516	0/116	0

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
145 (VII)	3373	0.2	11	6	0/8	0
	3210	63	46	0.4	0/26	0
	3245	63	2	0.02	0/2	0
	3249	63	50	0.4	0/50	0
372 (VII)	3276	76	1846	4.8	58/58	100
	2583	76	1128	3	101/101	100
	3209	76	735	1.9	93/93	100
	3374	3	36	3.5	34/34	100
	3292	4	8	0.8	8/8	100
	3294	11	1	0.01	1/1	100
	3241	76	914	2.4	105/105	100
	3247	76	904	2.4	42/42	100
	3286	11	976	4.5	145/147	99
	3244	11	138	0.6	65/66	98
	3291	3	130	13	68/70	97
	3295	11	209	1	81/84	96
	3287	4	19	1.9	18/19	95
	3371	3	160	16	90/98	92
	3288	11	53	0.2	48/53	91
	3312	4	9	0.9	8/9	89
	3273	3	256	25	11/103	11
	3268	11	361	1.6	0/83	0
	3289	11	132	0.6	0/89	0
	3271	4	105	11	0/94	0
	3274	3	20	1.9	0/20	0
	3373	3	1	0.1	0/1	0
	3372	3	1	0.1	0/1	0
	3377	3	3	0.3	0/3	0
	3368	3	5	0.6	0/5	0
	3245	76	1	0.01	0/1	0

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^4 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
462 (VII)	3291	21	433	5	116/116	100
	3276	6	30	1	29/29	100
	3209	21	649	7.5	81/81	100
	3241	21	94	1.1	94/94	100
	3247	24	14	0.7	12/12	100
	3293	6	97	3.1	83/83	100
	3295	6	22	0.7	20/20	100
	3292	21	313	3.6	79/80	99
	3371	21	67	0.8	56/58	97
	3374	21	163	1.7	108/113	96
	3287	21	53	0.6	47/49	96
	3369	21	148	1.7	106/111	95
	3312	21	80	0.9	64/71	90
	3271	6	453	14	0/80	0
	3274	6	140	4.4	0/73	0
	3268	21	1508	17	0/112	0
	3280	21	3348	38	0/81	0
	3289	21	293	3.4	0/102	0
	3273	21	1772	20	0/119	0
	3373	21	32	0.4	0/29	0
	3368	21	86	1	0/75	0
	3370	21	45	0.5	0/42	0
	3372	21	28	0.3	0/28	0
	3210	24	6	0.3	0/5	0
	3245	24	4	0.2	0/4	0
	3249	24	1	0.05	0/1	0
463 (VII)	3291	27	275	1.7	98/98	100
	3276	15	114	1.2	98/98	100
	3371	27	244	1.5	93/93	100

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
463 (VII)	3369	27	307	1.9	111/111	100
	3374	27	460	2.9	92/92	100
	3209	15	526	5.7	110/110	100
	3241	15	206	2.2	104/104	100
	3247	15	213	2.3	90/90	100
	3287	9	4	0.1	4/4	100
	3293	27	21	0.1	21/21	100
	3289	27	86	0.5	0/45	0
	3368	27	214	1.3	0/50	0
	3370	27	11	0.07	0/2	0
	3372	27	190	1.2	0/88	0
	3377	27	1	0.01	0/1	0
	3373	27	3	0.02	0/3	0
	3268	27	452	2.8	0/92	0
	3273	27	378	2.4	0/96	0
	3274	27	201	1.3	0/93	0
38 (VIII)	3291	73	169	1.9	64/64	100
	3276	35	117	0.5	99/99	100
	3244	35	75	0.3	67/67	100
	3373	73	479	5.3	78/78	100
	3314	73	564	6.3	98/98	100
	3288	73	718	8	85/86	99
	3294	73	63	0.7	52/55	95
	3240	35	50	0.2	46/49	94
	3286	73	753	8.4	62/78	79
	3246	73	151	1.7	51/73	70
	3368	73	477	5.3	53/89	60
	3210	35	70	0.3	17/60	28
	3293	73	519	5.8	0/80	0

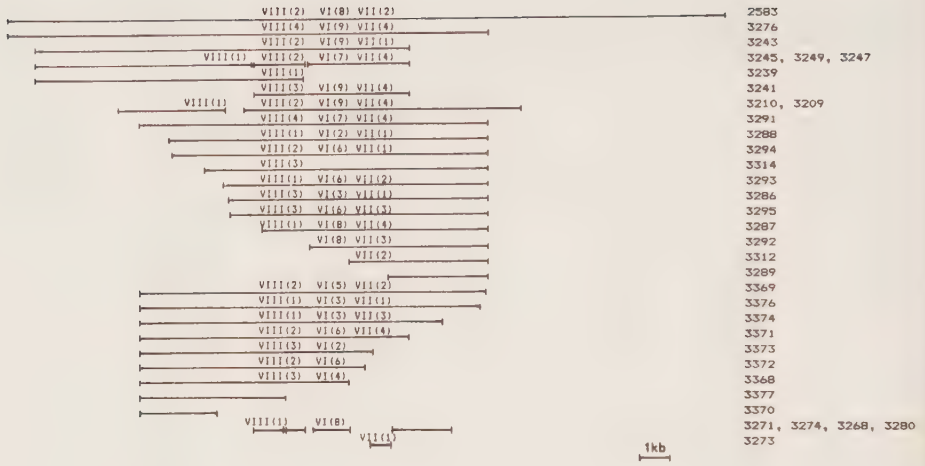
Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10^6 Überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
38 (VIII)	3295	73	407	4.6	0/92	0
	3209	35	70	0.3	0/61	0
	3247	35	145	0.6	0/121	0
	3249	35	92	0.4	0/67	0
	3271	35	72	0.3	0/57	0
	3268	35	113	0.4	0/94	0
159 (VIII)	3291	83	3	0.3	3/3	100
	3276	91	145	1.5	91/91	100
	3371	83	53	5.3	50/50	100
	3369	83	20	2	19/19	100
	3376	42	16	1.6	16/16	100
	3373	42	16	1.6	15/15	100
	3314	42	3	0.3	3/3	100
	3286	42	109	11	88/88	100
	3295	42	1	0.1	1/1	100
	3209	91	593	6.2	103/103	100
	3241	91	187	2	116/116	100
	3368	83	2	0.2	1/1	100
	2583	91	54	0.6	41/42	98
	3374	42	83	8.4	71/73	97
	3249	91	687	7.2	90/106	85
	3372	83	20	0.2	5/8	63
	3271	83	245	25	14/111	13
	3292	83	7	0.7	0/7	0
	3274	83	9	0.9	0/9	0
	3268	83	73	7.3	0/68	0
	3287	42	2	0.2	0/2	0
	3210	91	12	0.1	0/12	0
	3247	91	420	4.4	0/105	0

Tab. 3: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante	pMS-Plasmide	Reg.rate	*TRP1*-Prototrophe pro		*FAS/TRP* Cotransformation	
			Platte	10*überlebende	ausgezählte Kolonien	Anteil *FAS*- unter *TRP*-Prototrophen
		%			*FAS*$^+$/*TRP*$^+$	%
775 (VIII)	3291	23	396	3.9	105/105	100
	3371	23	579	5.7	102/102	100
	3369	23	715	7	101/101	100
	3295	23	23	0.2	19/19	100
	3287	23	11	0.1	3/3	100
	3244	32	23	0.2	22/23	96
	3368	23	23	0.2	7/8	88
	3241	32	23	0.2	20/23	87
	3276	32	29	0.3	24/29	83
	3372	23	17	0.2	5/7	71
	2583	32	30	0.3	17/30	57
	3249	23	81	0.8	21/47	45
	3209	32	37	0.4	15/37	41
	3271	10	4	0.1	0/4	0
	3268	10	1	0.03	0/1	0
	3292	10	2	0.07	0/2	0
	3370	10	1	0.03	0/1	0
	3210	32	16	0.2	0/16	0
1330 (VIII)	3291	96	171	0.6	93/93	100
	3276	6	7	0.9	7/7	100
	3373	4	1336	107	82/82	100
	3314	96	8	0.03	8/8	100
	3286	96	576	2	108/108	100
	3209	6	2	0.3	2/2	100
	3294	6	2	0.3	2/2	100
	~~3293~~ 3293	~~6~~	~~2~~	0.3	2/2	100
	3295	6	2	0.3	2/2	100
	3289	79	5	0.04	0/5	0
	3292	4	2	0.2	0/2	0
	3241	2	7	1	0/7	0

a)



b)

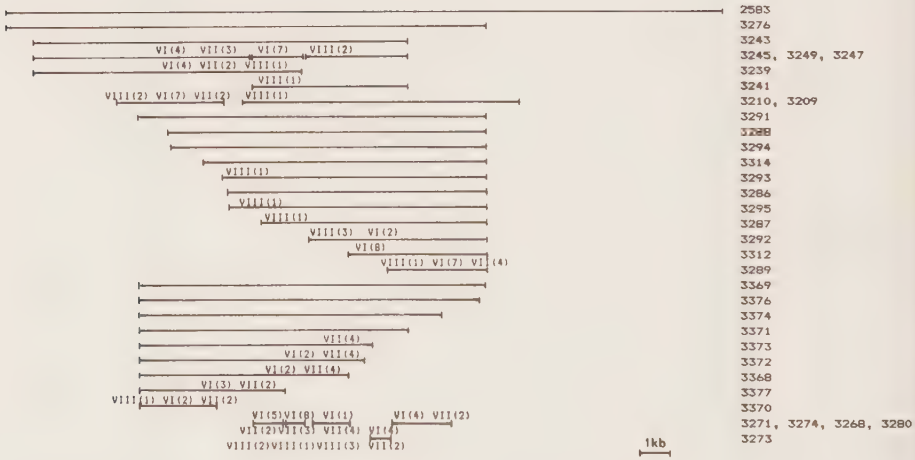


Abb.22: Physikalische Karte und Transformations-Eigenschaften der in dieser Arbeit konstruierten *FAS2*-Subklone (Legende s. S. 109)

Abb.22: Physikalische Karte und Transformations-Eigenschaften der in dieser Arbeit konstruierten *FAS2*-Subklone

(a) Die durch einen bestimmten Subklon transformierten *fas2*-Mutanten sind hinsichtlich Anzahl (arabische Zahl in Klammern) und Komplementationsgruppen-Zugehörigkeit (römische Zahl) auf dem entsprechenden subklonierten Gen-Fragment vermerkt.

(b) Hier ist angegeben, in wievielen Fällen die einzelnen Subklone n i c h t in der Lage waren, *fas2*-Mutanten einer bestimmten Komplementationsgruppe zu transformieren. Zeichenerklärung wie unter (a).

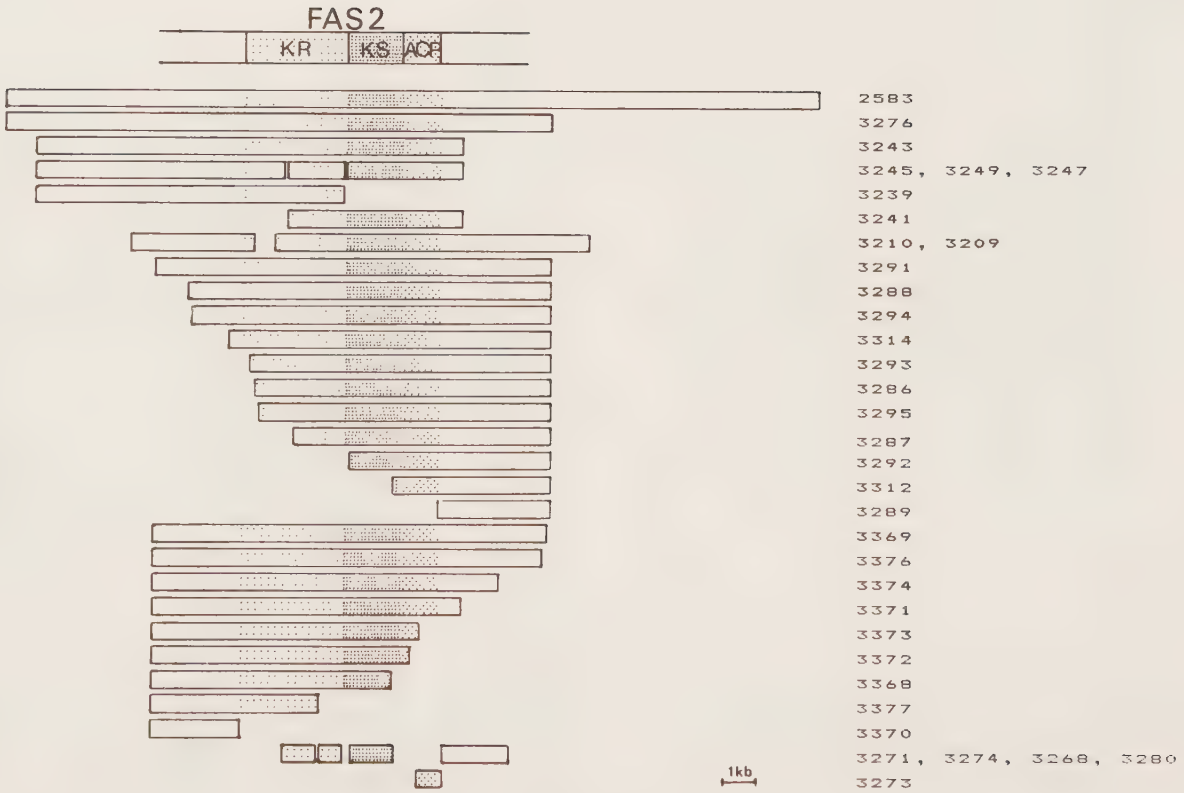


Abb.23: Reihenfolge und Ausdehnung der drei katalytischen Domänen im *FAS2*-Gen (Legende s.S. 111)

Abb.23: Reihenfolge und Ausdehnung der drei katalytischen Domänen im *FAS2*-Gen

Die Darstellung basiert auf den Transformationsdaten in Tab.3 und Abb.22. Die Zahlen geben die Nummern der betreffenden pMS-Klone an.

KR = ß-Ketoacylreduktase

KS = ß-Ketoacylsynthase

ACP = Acyl-Carrier-Protein

Mit einer einzigen Ausnahme (*fas2*-392) zeigten alle untersuchten *fas2*-Mutanten ungefähr gleiche Transformationsraten hinsichtlich *TRP1*. Die Mutante *fas2*-392 (Komplementationsgruppe IV) fiel durch besonders niedrige Regenerationsraten auf der einen und hohe Transformationsraten auf der anderen Seite auf. Von den 6 untersuchten pleiotropen *fas2*-Mutanten (Komplementationsgruppe IV), ließen sich nur drei (*fas2*-392, *fas2*-1368 und *fas2*-1910) bestimmten Bereichen des *FAS2*-Gens eindeutig zuordnen. Demnach befindet sich die Mutation *fas2*-392 im Bereich der Ketoacyl-Synthase Domäne, die Mutation *fas2*-1368 innerhalb der Acyl-Carrier-Protein Region und die Mutation *fas2*-1910 innerhalb der Ketoacyl-Synthase Region (vgl. Tab.3). Wie schon bei den entsprechenden *fas1*-Mutanten beobachtet, können also auch in *FAS2* pleiotrope Mutationen über den ganzen Genbereich verteilt vorkommen. Demgegenüber ergibt das Transformationsverhalten der drei übrigen pleiotropen Mutanten (*fas2*-152, *fas2*-219 und *fas2*-1098) kein so klares Bild. Scheinbar ließen sie sich durch mehrere, nicht überlappende und in ihrer Gesamtheit den ganzen *FAS2*-Bereich weitgehend abdeckende Subklone transformieren. Eine Erklärung dieser Befunde ohne zusätzliche Versuche ist schwierig. Bei *fas2*-1098 könnten die Befunde durch eine starke Reversionsneigung dieser Mutante bedingt sein. Obwohl vor jedem Transformationsversuch ein Revertantentest durchgeführt worden war und nur reversionsfreie Klone transformiert wurden, traten bei *fas2*-1098 nach der Transformation auch auf der Kontrollplatte (ohne DNA) *FAS*-prototrophe Kolonien auf. Bei

fas2-152 und *fas2-219* ist die Ursache für ihr ungewöhnliches Transformationsverhalten möglicherweise darin zu suchen, daß beim "Einbringen" von DNA in die Zellen irgendetwas geschieht, was eine Reversion zum *FAS*$^+$-Phänotyp begünstigt. Bei den Kontrollansätzen o h n e Plasmid-DNA wurden in beiden Mutanten keine Revertanten beobachtet.

Wie aus Tab.3 weiterhin hervorgeht, sind in ihr 9 Plasmide enthalten - davon 8 in dieser Arbeit konstruiert - , die offensichtlich das gesamte *FAS2*-Gen enthalten. Sie zeichnen sich alle durch praktisch 100%ige Co-Transformation der beiden Mutationen *fas2* und *trp1* aus. Gleichzeitig transformierten diese Plasmide alle untersuchten *fas2*-Mutanten, unabhängig von deren Komplementationszugehörigkeit, mit hoher Frequenz. Wie Abb.23 zeigt, sollten nicht nur die *FAS2*-Klone pMS 3276, pMS 3291 und pMS 3371 , sondern auch pMS 3369, pMS 3374, pMS 3376, pMS 3288 und pMS 3294 das gesamte Gen enthalten. Die Transformationsraten der letztgenannten Plasmide betrugen jedoch nur ca. 50-90% der für die drei zuerst genannten Klone charakteristischen Werte (vgl. Tab.3). Dennoch waren auch die hierbei entstehenden *TRP1*-Transformanten gewöhnlich zu 100% *FAS2*-prototroph. In allen Fällen erfolgt demnach die Rekonstitution der *FAS*-Prototrophie über einen Komplementationsmechanismus.
Wenn gelegentlich mit Plasmiden, die nicht das gesamte *FAS2*-Gen enthielten, ebenfalls eine scheinbar 100%ige *FAS/TRP* Co-Transformation beobachtet wurde (vgl. Tab.3), so mag dies darauf zurückzuführen sein, daß auf den Selektiv-Nährböden nicht immer zwischen Komplementanten und papillär wachsenden Rekombinanten klar

unterschieden werden konnte.

Ein wichtiger Nebeneffekt der in dieser Arbeit durchgeführten Subklonierung von *FAS2*-DNA aus dem ursprünglich isolierten *FAS2*-Klon pMS 2583 war - neben der *FAS2* Domänen-Reihenfolge - die Entwicklung von *FAS2*-Klonen mit deutlich verbesserten Transformationseigenschaften. Der Ausgangsklon pMS 2583 (vgl. Abb.23) zeigte - obwohl er das gesamte *FAS2*-Gen enthielt - in den meisten Fällen keine hohen Transformationsraten. Die Ursache hierfür dürfte vermutlich in der Größe des Plasmides (>30 kb) zu suchen sein. Verglichen damit sind die Transformations-Eigenschaften der aus pMS 2583 abgeleiteten Klone in der Reihenfolge pMS 3371, pMS 3288, pMS 3276, pMS 3291, pMS 3294, pMS 3376, pMS 3374 und pMS 3369 bis zu 20 Mal besser. Diese Zunahme ist - wahrscheinlich ursächlich - korreliert mit der Reduzierung der in diesen Klonen enthaltenen DNA-Insertionen. Der *FAS2*-Klon mit den zur Zeit besten Transformationseigenschaften ist demnach pMS 3371 (vgl. Tab.3).

3.6. Mitotische Stabilität von *FAS2/TRP1*-Transformanten

Frühere Untersuchungen von L.Roberts am hiesigen Institut hatten gezeigt, daß *FAS1*-Transformanten, welche intakte extrachromosomale *FAS1*-DNA enthielten, mitotisch instabil waren. Diese Eigenschaft war auf Grund der extrachromosomalen Natur der betreffenden, komplementierenden Plasmide zu erwarten. Mitotische Segreganten solcher *FAS*-Transformanten verloren bei Wachstum auf nicht-selektivem Medium (YEP/FS-Agar) innerhalb weniger Generationen die Plasmid-DNA und wurden dabei zum größten Teil wieder *fas1*-auxotroph. Da zur Komplementation der *fas*-Mutationen durch intakte *FAS*-DNA keine Integration des Plasmides in das Hefe-Genom erforderlich ist, war die beobachtete mitotische Instabilität der entsprechenden Transformanten verständlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch für *FAS2*-Transformanten gezeigt werden, daß diese überwiegend mitotisch instabil waren, sofern sie mit intakter *FAS2*-DNA transformiert worden waren.

Im Gegensatz dazu wurden bei *FAS2*-Transformanten, welche durch integrative Transformation entstanden waren, sowohl mitotisch stabile als auch mitotisch instabile Segreganten beobachtet. Dies war ein zunächst überraschender Befund, da eigentlich nur mitotisch stabile Nachkommen erwartet worden waren. Eine genauere molekularbiologische Charakterisierung von entsprechenden *FAS1*-Transformanten hatte jedoch gezeigt, daß

in ihnen neben der ins Hefe-Genom integrierten Plasmid-DNA auch noch selbstreplizierende, extrachromosomale Plasmid-Moleküle vorlagen (9, 59). *FAS2*-Subklone, die entweder den Anfangs- oder den Endbereich des *FAS2*-Gens enthalten, können durch chromosomale Integration (einfaches "crossing over") des gesamten Plasmids *fas2*-Mutanten in *FAS2*-Prototrophe überführen. Die dabei entstandene partielle Duplikation des *FAS2*-Gens in der Transformante ist selbst eine instabile DNA-Struktur und führt gelegentlich zur Rückbildung *fas2*-negativer Segreganten (19). Das papilläre Wachstum solcher Transformanten auf Selektivmedium (YEP-Agar) deutet auf eine ständige Segregation in *fas2*-auxotrophe und *FAS2*-prototrophe Nachkommen hin. Demgegenüber sollten Transformanten, deren *fas2*-Mutation durch Genkonversion oder doppeltes "crossing over" revertiert wurde, mitotisch stabil sein.

In dieser Arbeit wurden die bei der Co-Transformation von *fas2/trp1*-Doppelmutanten mit *TRP1/ARS1*-haltigen *FAS2*-Subklonen entstehenden Transformanten auf ihre mitotische Stabilität sowohl bezüglich *TRP1* als auch bezüglich *FAS2* getestet. Hinsichtlich der Stabilität der beiden Genmarken in derselben Transformante sind folgende Möglichkeiten denkbar:

(1) Sowohl der *TRP*$^+$- als auch der *FAS*$^+$-Charakter der Transformantenzelle sind zu 100% mitotisch stabil. Dieser Fall wurde besonders dann beobachtet, wenn die Mutanten mit großen Plasmid-DNAs (z.B.

pMS 2583), die außer dem intakten *FAS2*-Gen noch überschüssige Hefe-DNA enthielten, transformiert worden waren. War in solchen Fällen eine Transformante - wider Erwarten - für *FAS*$^+$ mitotisch stabil, so war sie es häufig auch für *TRP*$^+$. Diese gleichzeitige mitotische Stabilität für den *FAS*$^+$- und den *TRP*$^+$-Phänotyp kann damit erklärt werden, daß die in den Transformanten enthaltenen Plasmide sowohl mit dem *TRP1*-Gen als auch mit dem *FAS2*-Gen integrativ rekombinieren können und in beiden Fällen mitotisch stabile *FAS*$^+$/*TRP*$^+$-Transformanten entstehen.

(2) Die Segreganten einer Transformantenzelle sind bzgl. des *FAS*$^+$-Charakters mitotisch instabil, bzgl. des *TRP*$^+$-Charakters jedoch zu 100% mitotisch stabil. Diese Kombination trat im Verlauf der Untersuchung lediglich sechsmal auf und läßt sich - *mutatis mutandis* - durch die unter (3) aufgeführten Argumente erklären.

(3) Der *FAS*$^+$-Charakter ist zu 100% mitotisch stabil, jedoch der *TRP1*-Charakter ist mitotisch instabil. Diese Kombination wurde am häufigsten beobachtet, und zwar meist nach Transformation mit Plasmiden, die nur Teile des *FAS2*-Gens enthielten. In einer dabei durch Rekombination entstehenden *FAS*-Transformante ist die immer noch vorhandene extrachromosomale Plasmid-DNA sowohl für die *TRP*-Prototrophie, als auch für deren mitotische Instabilität verantwortlich. An der Erhaltung der *FAS*-Prototrophie (mitotische Stabilität) ist sie jedoch nicht beteiligt.

(4) Der *FAS*$^{+}$- und der *TRP*$^{+}$-Charakter der Transformantenzelle zeigen in etwa dieselbe, meist hohe mitotische Instabilität. Diese Stuation wurde vor allem in Transformanten beobachtet, die durch Komplementation mit intakter *FAS2*-DNA (z.B. pMS 3371) entstanden waren und - erwartungsgemäß - für den *FAS*$^{+}$-Charakter mitotisch instabil waren. In solchen Transformanten gingen - bei Wachstum auf nicht-selektivem Medium (YEP/FS) - innerhalb weniger Generationen mit der *FAS*- gleichzeitig auch die *TRP*-Prototrophie verloren.

Tab.4: Mitotische Stabilität der durch Transformation mit *FAS2*-Subklonen erhaltenen *FAS2/TRP1*-Prototrophen

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.
Bezüglich Stamm- und Plasmid-Bezeichnung vgl. Tab.1 und 3 sowie Abb.14, 19 und 20.
Werte in Klammern geben den Anteil der auf Selektiv-Medium wachsenden Zellen an, bezogen auf die YEP/FS-Platte.
Römische Zahlen in Klammern hinter den Mutantennummern geben die Komplementationsgruppe an.

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
152 (IV)	3276	1	421	153 (36)	59 (14)
		2	215	113 (53)	17 (8)
	3291	1	417	129 (31)	98 (24)
		2	176	50 (28)	50 (28)
	3371	1	276	89 (32)	89 (32)
	3368	1	605	605 (100)	605 (100)
	3373	1	127	45 (35)	45 (35)
	3241	1	449	424 (94)	89 (32)
		2	440	208 (47)	161 (37)
	2583	1	198	198 (100)	8 (4)
		2	412	70 (17)	30 (7)
	3295	1	472	472 (100)	472 (100)
	3247	1	335	335 (100)	10 (3)
		2	565	565 (100)	565 (100)
	3372	1	857	857 (100)	89 (10)
	3273	1	1231	1231 (100)	41 (3)
	3274	1	679	679 (100)	57 (8)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
219 (IV)	3276	1	670	670 (100)	670 (100)
		2	540	540 (100)	540 (100)
	3291	1	577	577 (100)	577 (100)
		2	59	38 (64)	10 (17)
	3294	1	256	151 (59)	133 (52)
	3209	1	798	798 (100)	0 (0)
		2	576	576 (100)	576 (100)
		3	421	421 (100)	1 (0.2)
	3314	1	254	243 (96)	244 (96)
	3286	1	704	704 (100)	315 (45)
	3293	1	900	900 (100)	15 (2)
		2	341	341 (100)	341 (100)
	3240	1	186	186 (100)	10 (5)
	3241	1	1086	1072 (99)	1086 (100)
	3249	1	708	708 (100)	1 (0.1)
392 (IV)	3276	1	594	594 (100)	594 (100)
		2	65	7 (11)	5 (8)
	3291	1	376	372 (99)	363 (97)
		2	163	78 (48)	77 (47)
	3371	1	90	43 (48)	43 (48)
	3288	1	435	180 (41)	165 (38)
		2	206	104 (50)	103 (50)
		3	183	144 (79)	117 (64)
	3376	1	121	79 (65)	80 (66)
	3373	1	367	235 (64)	235 (64)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
392 (IV)	3314	1	195	101 (52)	92 (47)
	3286	1	417	417 (100)	196 (47)
	3293	1	451	451 (100)	415 (92)
	3294	1	598	571 (95)	583 (97)
	3374	1	106	44 (42)	44 (42)
	3369	1	177	55 (31)	58 (33)
		2	351	351 (100)	351 (100)
	3295	1	325	325 (100)	3 (0.9)
		2	702	702 (100)	3 (0.4)
	3292	1	618	618 (100)	3 (0.5)
	3287	1	267	267 (100)	137 (51)
	3209	1	143	109 (76)	7 (5)
		2	272	272 (100)	14 (5)
	3372	1	405	405 (100)	405 (100)
	3368	1	157	157 (100)	147 (94)
		2	237	237 (100)	237 (100)
	2583	1	986	986 (100)	986 (100)
	3268	1	540	540 (100)	540 (100)
1098 (IV)	3291	1	532	528 (99)	532 (100)
		2	175	175 (100)	175 (100)
		3	1660	1669 (100)	1660 (100)
	3371	1	462	462 (100)	462 (100)
		2	114	114 (100)	114 (100)
	3244	1	228	99 (43)	93 (41)
		2	188	67 (36)	54 (29)

.Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
1098 (IV)	3368	1	240	240 (100)	240 (100)
	3372	1	301	301 (100)	3 (1)
	3292	1	361	361 (100)	361 (100)
		2	241	241 (100)	241 (100)
	3209	1	477	477 (100)	465 (97)
		2	181	181 (100)	118 (65)
	2583	1	323	323 (100)	323 (100)
	3369	1	201	201 (100)	201 (100)
		2	136	136 (100)	136 (100)
	3247	1	327	318 (97)	314 (96)
		2	404	396 (98)	404 (100)
	3241	1	713	713 (100)	288 (40)
		2	792	314 (40)	282 (36)
	3374	1	143	140 (98)	143 (100)
		2	111	108 (97)	111 (100)
	3274	1	200	200 (100)	200 (100)
	3245	1	290	290 (100)	70 (24)
		2	237	237 (100)	237 (100)
	3287	1	52	52 (100)	52 (100)
	3239	1	120	120 (100)	120 (100)
		2	137	32 (23)	32 (23)
	3377	1	223	223 (100)	223 (100)
		2	231	231 (100)	231 (100)
	3249	1	226	226 (100)	226 (100)
		2	257	257 (100)	257 (100)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
1368 (IV)	3276	1	333	117 (35)	116 (35)
		2	587	171 (29)	144 (19)
	3291	1	1362	316 (23)	316 (23)
		2	513	158 (31)	158 (31)
		3	304	151 (50)	140 (46)
	3371	1	785	198 (25)	219 (28)
	2583	1	388	213 (55)	184 (47)
	3244	1	1007	299 (30)	228 (23)
	3292	1	316	176 (56)	98 (31)
		2	507	308 (61)	305 (60)
	3287	1	421	94 (22)	63 (15)
	3295	1	550	322 (59)	322 (59)
		2	595	139 (23)	139 (23)
	3312	1	437	437 (100)	437 (100)
		2	470	470 (100)	470 (100)
	3209	1	477	162 (34)	154 (32)
	3241	1	58	23 (40)	29 (50)
		2	26	6 (23)	6 (23)
	3247	1	297	293 (99)	294 (99)
		2	678	671 (99)	656 (97)
	3273	1	466	466 (100)	466 (100)
		2	665	665 (100)	665 (100)
		3	534	534 (100)	534 (100)
		4	373	373 (100)	373 (100)
1910 (IV)	3276	1	547	547 (100)	547 (100)
		2	171	170 (99)	171 (100)
	3374	1	240	8 (3)	240 (100)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
1910 (IV)	3294	1	849	849 (100)	305 (36)
		2	86	0 (0)	86 (100)
	2583	1	513	513 (100)	513 (100)
	3292	1	173	0 (0)	173 (100)
	3209	1	402	114 (28)	402 (100)
	3373	1	583	583 (100)	583 (100)
		2	205	205 (100)	205 (100)
	3287	1	133	133 (100)	133 (100)
7 (VI)	3276	1	631	631 (100)	631 (100)
	3291	1	833	833 (100)	833 (100)
	3371	1	409	145 (35)	145 (35)
	3374	1	187	67 (36)	76 (41)
		2	508	150 (30)	150 (30)
	3241	1	535	535 (100)	535 (100)
		2	1201	1201 (100)	95 (8)
	3244	1	509	509 (100)	509 (100)
		2	508	128 (25)	123 (24)
	3209	1	773	773 (100)	773 (100)
		2	905	905 (100)	172 (19)
		3	681	681 (100)	681 (100)
		4	586	586 (100)	141 (24)
	3376	1	500	280 (56)	280 (56)
	3295	1	68	68 (100)	42 (62)
	3293	1	724	724 (100)	108 (15)
	3286	1	920	920 (100)	320 (35)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
7 (VI)	2583	1	540	540 (100)	540 (100)
		2	378	361 (96)	192 (51)
	3287	1	272	272 (100)	68 (25)
	3372	1	770	770 (100)	770 (100)
		2	973	973 (100)	14 (1)
	3292	1	594	594 (100)	594 (100)
		2	916	916 (100)	104 (11)
	3268	1	1652	1652 (100)	15 (1)
15 (VI)	3276	1	496	496 (100)	496 (100)
		2	354	202 (57)	174 (49)
	3291	1	265	265 (100)	265 (100)
		2	447	98 (22)	85 (19)
	2583	1	780	780 (100)	780 (100)
		2	368	332 (90)	129 (35)
	3369	1	398	61 (15)	61 (15)
	3293	1	272	272 (100)	4 (1)
		2	539	539 (100)	1 (0.2)
	3294	1	130	130 (100)	130 (100)
		2	252	252 (100)	252 (100)
	3244	1	252	252 (100)	252 (100)
	3247	1	480	480 (100)	7 (1)
		2	454	454 (100)	454 (100)
	3287	1	251	251 (100)	251 (100)
	3241	1	438	438 (100)	438 (100)
		2	684	684 (100)	27 (4)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
15 (VI)	3268	1	661	661 (100)	136 (21)
		2	492	492 (100)	32 (7)
		3	693	693 (100)	26 (4)
		4	108	108 (100)	8 (7)
	3209	1	230	230 (100)	230 (100)
		2	921	921 (100)	317 (34)
	3292	1	397	397 (100)	397 (100)
46 (VI)	3276	1	259	259 (100)	259 (100)
		2	690	690 (100)	684 (99)
	3291	1	185	68 (37)	65 (35)
	3247	1	342	342 (100)	342 (100)
		2	462	462 (100)	442 (96)
	3287	1	1168	1168 (100)	1168 (100)
	3294	1	330	310 (94)	313 (95)
	3295	1	581	581 (100)	581 (100)
	3369	1	271	126 (46)	46 (17)
	3209	1	534	60 (11)	70 (13)
		2	600	500 (83)	600 (100)
	3241	1	540	540 (100)	540 (100)
		2	772	97 (13)	772 (100)
	2583	1	746	746 (100)	746 (100)
		2	438	438 (100)	438 (100)
	3268	1	348	348 (100)	23 (7)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
75 (VI)	3276	1	258	103 (40)	71 (28)
		2	514	192 (37)	169 (33)
	3291	1	317	192 (61)	166 (52)
		2	109	62 (57)	62 (57)
	3371	1	162	68 (42)	84 (52)
		2	252	106 (42)	106 (42)
	2583	1	768	339 (44)	279 (36)
		2	631	294 (47)	268 (42)
	3244	1	138	81 (59)	72 (52)
		2	325	306 (94)	205 (63)
	3287	1	231	231 (100)	32 (14)
	3292	1	428	428 (100)	428 (100)
	3209	1	813	813 (100)	27 (3)
	3268	1	709	709 (100)	24 (3)
	3241	1	603	603 (100)	119 (20)
		2	784	784 (100)	144 (18)
	3295	1	704	704 (100)	704 (100)
	3247	1	805	805 (100)	206 (26)
		2	719	719 (100)	261 (36)
	3294	1	323	134 (41)	98 (30)
	3372	1	380	380 (100)	225 (59)
	3368	1	152	152 (100)	81 (53)
		2	376	376 (100)	129 (34)
117 (VI)	3276	1	418	306 (73)	272 (65)
		2	21	10 (48)	10 (48)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
75 (VI)	3276	1	258	103 (40)	71 (28)
		2	514	192 (37)	169 (33)
	3291	1	317	192 (61)	166 (52)
		2	109	62 (57)	62 (57)
	3371	1	162	68 (42)	84 (52)
		2	252	106 (42)	106 (42)
	2583	1	768	339 (44)	279 (36)
		2	631	294 (47)	268 (42)
	3244	1	138	81 (59)	72 (52)
		2	325	306 (94)	205 (63)
	3287	1	231	231 (100)	32 (14)
	3292	1	428	428 (100)	428 (100)
	3209	1	813	813 (100)	27 (3)
	3268	1	709	709 (100)	24 (3)
	3241	1	603	603 (100)	119 (20)
		2	784	784 (100)	144 (18)
	3295	1	704	704 (100)	704 (100)
	3247	1	805	805 (100)	206 (26)
		2	719	719 (100)	261 (36)
	3294	1	323	134 (41)	98 (30)
	3372	1	380	380 (100)	225 (59)
	3368	1	152	152 (100)	81 (53)
		2	376	376 (100)	129 (34)
117 (VI)	3276	1	418	306 (73)	272 (65)
		2	21	10 (48)	10 (48)
		3	385	237 (62)	144 (37)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
117 (VI)	3291	1	527	155 (29)	155 (29)
		2	306	129 (42)	129 (42)
	3371	1	191	98 (51)	98 (51)
	2583	1	600	64 (11)	83 (14)
		2	578	146 (25)	142 (25)
	3288	1	495	228 (46)	228 (46)
	3241	1	573	573 (100)	573 (100)
	3209	1	470	470 (100)	40 (9)
		2	720	720 (100)	192 (27)
	3374	1	457	205 (45)	107 (23)
	3373	1	570	158 (28)	158 (28)
	3286	1	649	649 (100)	301 (46)
	3295	1	813	813 (100)	813 (100)
	3292	1	680	680 (100)	680 (100)
		2	353	353 (100)	353 (100)
	3376	1	404	175 (43)	175 (43)
		2	622	311 (50)	311 (50)
	3293	1	1288	1288 (100)	130 (10)
	3369	1	215	122 (57)	111 (52)
		2	527	527 (100)	527 (100)
	3268	1	663	663 (100)	37 (6)
		2	667	667 (100)	663 (99)
	3247	1	641	641 (100)	30 (5)
	3372	1	1114	1114 (100)	11 (1)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
446 (VI)	3276	1	17	17 (100)	17 (100)
		2	308	308 (100)	308 (100)
	2583	1	249	227 (91)	165 (66)
		2	809	394 (49)	422 (52)
		3	495	495 (100)	495 (100)
	3244	1	450	450 (100)	450 (100)
		2	498	498 (100)	498 (100)
	3241	1	473	249 (53)	265 (56)
	3292	1	960	960 (100)	0 (0)
	3287	1	946	946 (100)	35 (4)
	3295	1	890	845 (95)	45 (5)
	3293	1	278	278 (100)	128 (46)
	3247	1	577	577 (100)	212 (37)
		2	539	539 (100)	185 (34)
1230 (VI)	3276	1	474	474 (100)	474 (100)
		2	103	103 (100)	103 (100)
	3291	1	491	414 (84)	414 (84)
		2	40	30 (75)	28 (70)
		3	181	181 (100)	181 (100)
		4	213	79 (37)	60 (28)
	3371	1	326	192 (59)	192 (59)
		2	226	157 (69)	157 (69)
	3244	1	701	701 (100)	701 (100)
	3209	1	340	340 (100)	340 (100)
		2	650	650 (100)	650 (100)
	3294	1	293	293 (100)	293 (100)
		2	170	170 (100)	170 (100)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
1230 (VI)	2583	1	51	51 (100)	51 (100)
		2	79	79 (100)	79 (100)
	3241	1	695	695 (100)	695 (100)
		2	864	864 (100)	864 (100)
	3292	1	580	580 (100)	9 (2)
	3372	1	216	216 (100)	216 (100)
		2	164	164 (100)	164 (100)
	3268	1	1095	1095 (100)	54 (5)
		2	351	351 (100)	351 (100)
		3	466	466 (100)	466 (100)
	3287	1	595	499 (84)	14 (2)
		2	465	465 (100)	65 (14)
	3368	1	42	42 (100)	42 (100)
		2	88	88 (100)	84 (95)
1373 (VI)	3276	1	358	358 (100)	349 (97)
		2	395	395 (100)	395 (100)
		3	269	269 (100)	269 (100)
	2583	1	720	720 (100)	720 (100)
		2	228	228 (100)	228 (100)
	3241	1	572	115 (20)	345 (60)
		2	274	199 (73)	169 (62)
	3244	1	545	545 (100)	545 (100)
		2	75	75 (100)	75 (100)
	3247	1	334	334 (100)	13 (4)
		2	558	558 (100)	558 (100)
	3268	1	264	152 (58)	173 (66)
		2	553	553 (100)	153 (28)
	3287	1	809	809 (100)	809 (100)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
1373 (VI)	3292	1	219	219 (100)	219 (100)
229 (VI)	3291	1	157	121 (77)	87 (55)
	3371	1	263	225 (86)	248 (94)
		2	69	33 (48)	31 (45)
	3369	1	88	31 (35)	88 (100)
		2	144	89 (62)	68 (47)
	3374	1	652	652 (100)	652 (100)
		2	245	102 (42)	90 (37)
	3287	1	275	275 (100)	275 (100)
		2	514	124 (24)	242 (47)
	3368	1	236	236 (100)	236 (100)
	3372	1	252	252 (100)	252 (100)
		2	465	465 (100)	465 (100)
	3288	1	693	693 (100)	693 (100)
		2	149	112 (75)	99 (66)
	3376	1	390	390 (100)	390 (100)
		2	166	131 (79)	136 (82)
	3373	1	79	37 (47)	37 (47)
	3286	1	402	402 (100)	1 (0.2)
		2	511	511 (100)	17 (3)
	3293	1	210	210 (100)	109 (52)
		2	329	329 (100)	329 (100)
145 (VII)	3276	1	722	45 (6)	44 (6)
	3291	1	268	113 (42)	95 (35)
		2	558	558 (100)	558 (100)
		3	302	302 (100)	302 (100)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
145 (VII)	3371	1	1392	1392 (100)	1392 (100)
	3374	1	307	100 (33)	100 (33)
	3376	1	972	155 (16)	155 (16)
	3292	1	972	330 (34)	74 (8)
	3287	1	313	313 (100)	149 (48)
		2	720	123 (17)	100 (14)
	3209	1	484	63 (13)	63 (13)
		2	452	51 (11)	51 (11)
	3295	1	305	112 (37)	116 (38)
		2	976	271 (28)	263 (27)
	3241	1	500	70 (14)	59 (12)
		2	586	129 (22)	125 (21)
	2583	1	357	357 (100)	357 (100)
	3247	1	716	716 (100)	702 (98)
		2	378	91 (24)	65 (17)
	3273	1	1125	1125 (100)	1125 (100)
		2	938	938 (100)	938 (100)
372 (VII)	3276	1	291	120 (41)	112 (38)
		2	468	172 (37)	163 (35)
		3	262	247 (94)	249 (95)
	3291	1	48	21 (44)	21 (44)
	3371	1	92	92 (100)	92 (100)
	2583	1	1277	1277 (100)	1277 (100)
		2	251	251 (100)	251 (100)
	3209	1	635	635 (100)	635 (100)
		2	469	59 (13)	43 (9)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
372 (VII)	3374	1	79	79 (100)	79 (100)
	3292	1	559	559 (100)	27 (5)
		2	562	562 (100)	76 (14)
	3294	1	414	414 (100)	414 (100)
	3241	1	1079	1055 (98)	257 (24)
		2	977	431 (44)	448 (46)
		3	94	25 (27)	24 (26)
	3247	1	620	620 (100)	620 (100)
		2	680	680 (100)	375 (55)
	3286	1	279	279 (100)	279 (100)
		2	346	305 (88)	169 (49)
	3244	1	268	268 (100)	153 (57)
		2	564	564 (100)	564 (100)
	3295	1	970	964 (99)	304 (31)
		2	487	487 (100)	487 (100)
	3287	1	412	412 (100)	412 (100)
		2	691	691 (100)	691 (100)
	3288	1	709	687 (97)	701 (99)
	3312	1	212	212 (100)	121 (57)
462 (VII)	3291	1	1003	1003 (100)	1003 (100)
		2	237	76 (32)	76 (32)
	3371	1	294	24 (8)	24 (8)
	3241	1	701	201 (29)	243 (35)
		2	223	201 (90)	218 (98)
	3247	1	852	852 (100)	852 (100)
		2	1306	1306 (100)	1287 (99)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
462 (VII)	3293	1	462	205 (44)	181 (39)
	3295	1	384	146 (38)	142 (37)
	3292	1	790	790 (100)	109 (14)
		2	396	396 (100)	184 (46)
	3374	1	251	53 (21)	53 (21)
	3287	1	1005	1005 (100)	984 (98)
		2	1236	1236 (100)	34 (3)
	3369	1	470	222 (47)	189 (40)
		2	672	164 (24)	64 (10)
	3312	1	561	561 (100)	6 (1)
		2	440	440 (100)	3 (1)
463 (VII)	3276	1	307	307 (100)	307 (100)
		2	364	87 (24)	69 (19)
	3291	1	1016	1016 (100)	1016 (100)
	3371	1	557	119 (21)	119 (21)
	3369	1	428	205 (48)	205 (48)
	3374	1	339	90 (27)	90 (27)
	3241	1	736	243 (33)	206 (28)
	3247	1	386	386 (100)	386 (100)
		2	476	476 (100)	197 (41)
	3287	1	392	392 (100)	208 (53)
		2	269	269 (100)	81 (30)
	3293	1	692	692 (100)	692 (100)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
38 (VIII)	3276	1	253	253 (100)	253 (100)
		2	185	185 (100)	185 (100)
	3291	1	287	242 (84)	189 (66)
		2	313	76 (24)	55 (18)
	3244	1	148	116 (78)	49 (33)
		2	551	551 (100)	551 (100)
	3373	1	224	212 (95)	224 (100)
		2	159	30 (19)	26 (16)
	3314	1	144	40 (28)	38 (26)
	3288	1	97	28 (29)	22 (23)
	3294	1	229	60 (26)	59 (26)
	3240	1	521	521 (100)	521 (100)
		2	595	595 (100)	146 (25)
	3286	1	148	148 (100)	148 (100)
	3246	1	256	256 (100)	11 (4)
	3368	1	181	181 (100)	181 (100)
	3210	1	181	181 (100)	181 (100)
		2	132	132 (100)	9 (7)
159 (VIII)	3276	1	327	327 (100)	327 (100)
		2	434	434 (100)	434 (100)
	3291	1	317	317 (100)	317 (100)
	3371	1	216	74 (34)	65 (30)
	3369	1	104	48 (46)	36 (35)
	3376	1	223	30 (13)	27 (12)
		2	235	98 (42)	98 (42)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
159 (VIII)	3373	1	278	61 (22)	36 (13)
		2	189	133 (70)	20 (11)
	3314	1	114	30 (26)	17 (15)
	3286	1	857	857 (100)	857 (100)
	3295	1	683	683 (100)	1 (0.1)
	3209	1	516	516 (100)	516 (100)
		2	311	311 (100)	135 (43)
	3241	1	802	802 (100)	802 (100)
		2	644	644 (100)	644 (100)
	2583	1	397	397 (100)	397 (100)
		2	255	255 (100)	255 (100)
	3374	1	86	0 (0)	2 (2)
		2	90	90 (100)	90 (100)
		3	283	86 (30)	86 (30)
	3249	1	479	479 (100)	6 (1)
		2	338	338 (100)	2 (1)
	3372	1	529	529 (100)	2 (0.4)
	3271	1	380	380 (100)	12 (3)
775 (VIII)	3291	1	547	224 (41)	210 (38)
	3371	1	136	136 (100)	136 (100)
		2	302	159 (53)	159 (53)
	3369	1	409	149 (36)	148 (36)
	3249	1	2077	2077 (100)	0 (0)
		2	231	231 (100)	0 (0)
	3209	1	127	127 (100)	123 (97)

Tab.4: (Fortsetzung)

fas2/trp1-Mutante Nr.	zur Transformation benutztes pMS-Plasmid	Transformante	angewachsene Kolonien pro Platte		
			YEP/FS Stammplatte	YEP Replika	-T/FS Replika
				%	%
1330 (VIII)	3276	1	721	721 (100)	721 (100)
		2	483	483 (100)	2 (0.4)
	3291	1	94	94 (100)	94 (100)
		2	80	80 (100)	80 (100)
	3373	1	73	39 (53)	20 (27)
		2	931	931 (100)	931 (100)
	3286	1	180	180 (100)	180 (100)
		2	39	17 (44)	17 (44)
	3209	1	379	379 (100)	379 (100)
	3294	1	378	378 (100)	378 (100)
	3293	1	565	565 (100)	565 (100)
	3295	1	970	970 (100)	970 (100)

3.7. Optimierung der Transformationseigenschaften von klonierter *FAS2*-DNA

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebene Subklonierung der *FAS2*-DNA hatte einmal zum Ziel, die Reihenfolge der drei katalytischen Zentren des *FAS2*-Gens festzustellen, zum anderen sollten dabei aber auch gleichzeitig die Transformationseigenschaften des ursprünglich isolierten *FAS2*-Klons pMS 2583 nach Möglichkeit verbessert werden. Es war dabei an die Konstruktion eines Plasmides gedacht, welches möglichst nur noch das *FAS2*-Gen mit den für seine Expression nötigen angrenzenden Bereichen enthielt, wobei das in ihm klonierte Hefe-DNA Segment auf jeden Fall wesentlich kleiner (ca. 6 kb) als die in dem ursprünglich isolierten *FAS2*-Klon pMS 2583 enthaltene Hefe-DNA (23.8 kb) sein durfte. Eine charakteristische Eigenschaft des gewünschten Plasmides sollte es sein, *fas2*-Mutanten aller Komplementationsgruppen mit hoher Effizienz zu komplementieren.

Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Transformationsversuche waren prinzipiell eine Wiederholung der in der vorangegangenen Versuchsreihe (vgl. Tab.3) durchgeführten Experimente, mit dem Unterschied, daß die Transformanten diesmal direkt auf ihren *FAS*$^+$-Charakter hin selektioniert wurden. Wenn immer ein Plasmid das gesamte *FAS2*-Gen enthielt, sollten seine Transformationsraten so hoch sein, daß eine vorgeschaltete Selektion von *TRP*$^+$-Transformanten nicht erforderlich war. Dadurch konnten in einem einzigen Versuchsansatz mehrere Plasmide

untersucht und ihre Eigenschaften somit direkt miteinander verglichen werden. Untersucht wurden zum einen diejenigen Plasmide, die bei den vorausgegangenen Transformationen (siehe 3.5.) mit allen untersuchten *fas2*-Mutanten eine 100%ige *TRP1/FAS2* Co-Transformation ergeben hatten (vgl. Tab.3). Zum anderen wurden auch solche Plasmide nochmals überprüft, bei denen gewisse Anhaltspunkte dafür vorlagen, daß auch in ihnen das intakte *FAS2*-Gen enthalten war, obwohl sie in den vorangegangenen Experimenten nicht in vollem Umfang die erwartete *TRP1/FAS2* Co-Transformation gezeigt hatten (z.B. pMS 3243).

Als Empfänger-Stämme wurden fünf *fas2*-Mutanten aus vier verschiedenen *FAS2*-Komplementationsgruppen (IV, VI, VII, VIII) verwendet, die sich in den vorangegangenen Untersuchungen als besonders gut transformierbar erwiesen hatten.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe sind in Tab.5 zusammengefaßt. Man sieht zunächst, daß offensichtlich nicht alle untersuchten Plasmide intakte *FAS2*-DNA enthalten. So vermochten z.B. die Plasmide pMS 3368, pMS 3372, pMS 3373 und pMS 3243 nicht alle in diesem Experiment untersuchten *fas2*-Mutanten zu transformieren. Sie enthielten also nicht das gesamte *FAS2*-Gen. Demgegenüber können die Plasmide pMS 2583, pMS 3294, pMS 3291, pMS 3276 und pMS 3288 zwar alle *fas2*-Mutanten zur *FAS2*-Prototrophie transformieren, enthalten demnach wohl die gesamte *FAS2*-DNA, sind aber hinsichtlich ihrer Transformationseffizienz offensichtlich verschieden. Die unterschiedlichen Transformationsraten hängen z.T. mit der Größe des Plasmides, d.h. mit der Größe des inserierten DNA-Fragmentes zusammen. Eine Zusammenstellung der in Tab.5 enthaltenen Subklone hinsichtlich

Lage und Größe legt diese Erklärung nahe (vgl. Abb.24). Andere Faktoren, wie die Bedeutung flankierender DNA-Sequenzen, kommen sicher noch dazu. So ist pMS 3371 auf Grund seiner Transformationsraten allen übrigen Plasmiden deutlich überlegen. Wie aus Abb.24 hervorgeht, ist es das kleinste Plasmid (15.6 kb) mit dem intakten *FAS2*-Gen. Die in pMS 3371 inserierte Hefe-DNA stimmt in ihrer Ausdehnung und Lage sehr gut mit den durch "Northern"-Hybridisierung ermittelten Daten überein (vgl.Abb.24). Man kann jedoch davon ausgehen, daß pMS 3371 "links" vom *FAS2*-Gen ca. 2 kb klonierte Hefe-DNA enthält, die nicht für die Expression dieses Gens notwendig ist. In pMS 3288 und pMS 3294 liegt wahrscheinlich ebenfalls intakte *FAS2*-DNA vor (siehe Tab.5 und Abb.23), diese beiden Plasmide sind aber gegenüber pMS 3291 und dem daraus abgeleiteten Klon pMS 3371 auf der "linken" Seite des *FAS2*-Gens um 1.5 kb verkürzt, besitzen aber trotzdem nur wenig schlechtere Transformationseigenschaften (vgl. Tab.5). Das Plasmid pMS 3371 enthält ca. 9.2 kb klonierte Hefe-DNA (vgl. Abb.20). Diese ist gegenüber dem Ausgangsklon pMS 2583 von dessen "linker" *BamHI*-Schnittstelle aus gesehen um ca. 4.4 kb und von dessen "rechter" *BamHI*-Schnittstelle aus gesehen um ca. 10.2 kb verkürzt. Das pMS 3371-Fragment war durch *Bal31*-Verdauung des Plasmides pMS 3291 entstanden, welches seinerseits durch *Bal31*-Abbau aus pMS 3276 hervorgegangen war. Das Plasmid pMS 3276 war aus pMS 2583 konstruiert worden und hatte gegenüber diesem ein 6.9 kb großes *SphI*-Fragment verloren.

Das oben als schlecht transformierend aufgeführte Plasmid pMS 3243 enthält nach "rechts" genauso viel und nach "links" ca. 3.5 kb mehr klonierte Hefe-DNA als das am besten transformierende Plasmid pMS

3371. Es transformierte aber dennoch nur drei der fünf getesteten *fas2*-Mutanten, und dies auch nur mit einer äußerst geringen Rate. Dieser überraschende Befund erklärt sich möglicherweise damit, daß während der Klonierung der drei hintereinandergeschalteten *EcoRI*-Fragmente zwischen den einzelnen Fragmenten eine kurze Sequenz eingefügt oder eliminiert wurde, ähnlich wie dies offensichtlich bei der Konstruktion von pMS 203 geschehen war (vgl.3.1.). Es wäre denkbar, daß dadurch der Leserahmen verschoben wurde und deshalb kein intaktes *FAS2*-Genprodukt mehr synthetisiert werden kann.

Neben der Transformationsrate wurde auch die mitotische Stabilität bzw. Instabilität der Transformanten ermittelt. Wie schon erwähnt, ist Transformation von *fas2*-Mutanten durch intakte *FAS2*-DNA grundsätzlich sowohl durch Rekombination als auch durch Komplementation, d.h. ohne Integration des Plasmides ins Chromosom, möglich. Im erstgenannten Fall entstehen mitotisch stabile und zweiten Fall mitotisch instabile Transformanten. Die mitotische Instabilität ist also bei einer Komplementation unabdingbar, aber *per se* noch kein Beweis. Tatsächlich wurden im vorliegenden Fall mit den Plasmiden pMS 3371 und pMS 3288 nur mitotisch instabile *FAS2*-Transformanten erhalten (siehe Tab.5), was mit einem Komplementations-Mechanismus in Einklang ist. Demgegenüber wurden mit den anderen, vermutlich auch noch das ganze *FAS2*-Gen enthaltenden Plasmiden teils mitotisch instabile, teils mitotisch stabile Segreganten beobachtet.

Durch die geschilderten Experimente konnte mit dem Plasmid pMS 3371 ein *FAS2*-Klon ermittelt werden, der für vier der fünf

untersuchten *fas2*-Mutanten eindeutig die besten Transformationseigenschaften besaß und wahrscheinlich nur noch wenig überschüssige, d.h. für die Expression von *FAS2* nicht notwendige, Hefe-DNA enthielt. Mit der in diesem Plasmid klonierten Hefe-DNA kann jetzt versucht werden, das *FAS1*-Gen (pMS 3021) mit dem *FAS2*-Gen in ein und demselben Plasmid zu fusionieren. Mit einem derartigen, kombinierten Klon können eine Reihe interessanter Untersuchungen zur Regulation der Fettsäuresynthetase-Produktion in der Hefezelle gemacht werden. Die oben geschilderten Experimente haben den Weg hierfür geebnet.

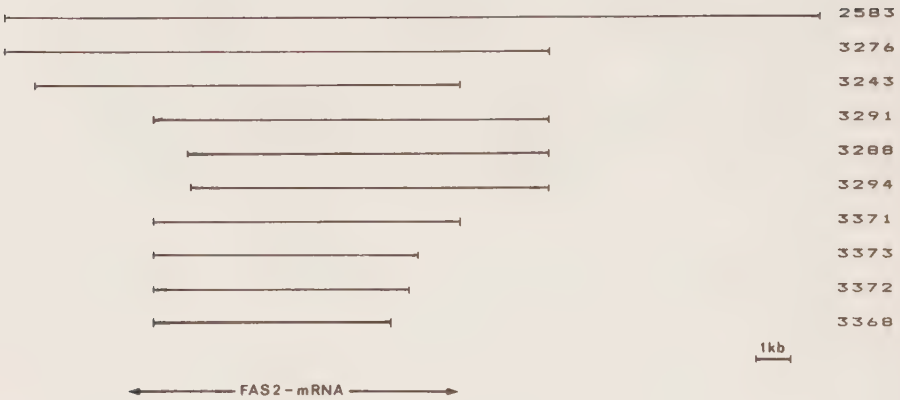


Abb.24: Zusammenstellung der zur direkten Transformation von *fas2*-Mutanten eingesetzten *FAS2*-Subklone

(vgl. Tab.5)

Es ist jeweils nur die in pMS 201 (bzw. pMS 202 bei pMS 3243) klonierte Hefe-DNA der Plasmide angegeben. Die Lage der *FAS2*-mRNA ist entsprechend den Daten von H.J. Höltke (40) eingetragen.

Tab.5: Transformation von *fas2*-Mutanten mit klonierter, potentiell intakter *FAS2*-DNA

Die römischen Zahlen in Klammern hinter den Mutantennummern geben die Komplementationsgruppe an. *FAS*-Prototrophe sind als Zahl der tatsächlich ausgezählten Kolonien pro Platte angegeben.

Nach Sphäroplastierung der Zellen wurden von einer Mutante jeweils gleiche Zellmengen in verschiedene Reagiergefäße gegeben und den einzelnen Ansätzen jeweils gleiche Mengen an Plasmid-DNA zugesetzt. Aus diesem Grund lassen sich die ausgezählten *FAS*-Prototrophen/Platte bei verschiedenen Plasmiden direkt miteinander vergleichen.

Weitere experimentelle Einzelheiten zur Durchführung der Transformationsversuche vgl. Material und Methoden.

* = mitotisch stabile Transformanten

Tab.5: Transformation von *fas2*-Mutanten mit klonierter, potentiell intakter *FAS2*-DNA

fas2-Mutante	Regenerationsrate	Transformationsvermögen der Plasmide									
		pMS 3371	pMS 3288	pMS 3276	pMS 3291	pMS 3294	pMS 2583	pMS 3373	pMS 3243	pMS 3368	pMS 3372
	%	*FAS*-Prototrophe/Platte									
219 (IV)	1.4	200	490	84	48	253	22	0	0	0	0
46 (VI)	7.1	2064	832	289	197	107*	200*	1112	1*	2*	14*
372 (VII)	3	2872	701	2104	1816	1000	278	0	1*	0	0
462 (VII)	22	1518	1366	463	276	235	92*	0	0	0	0
38 (VIII)	0.2	568	183	261*	536	17	189	295	2*	2*	0

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Reihenfolge der katalytischen Domänen innerhalb des multifunktionellen Fettsäuresynthetase-Gens *FAS2* der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewesen. Diese Untersuchungen sollten - neben der Aufklärung der *FAS2*-Genorganisation - auch zur Kenntnis der Proteinstruktur des Multienzymkomplexes Fettsäuresynthetase in Hefe beitragen.

In methodischer Hinsicht waren im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsversuche mit klonierter *FAS2*-DNA viele Befunde bestätigt worden, die zuvor in entsprechenden Experimenten mit klonierter *FAS1*-DNA schon beobachtet worden waren (10). Abweichend von den Befunden mit *FAS1* fiel bei der Transformation von *fas2/trp1*-Doppelmutanten mit Plasmiden, die sowohl *FAS2* als auch *TRP1* enthielten, lediglich auf, daß nicht immer die erwartete 100%ige *TRP/FAS*-Cotransformation stattfand: der Anteil *FAS*-prototropher Zellen unter den *TRP*-prototrophen Transformanten variierte zwischen 57% und 95% (vgl. Tab.3). Da diese Erscheinung vor allem bei großen, d.h. außer *FAS2* auch noch anderweitige Hefe-DNA enthaltenden Plasmiden beobachtet wurde (z.B. pMS 2583), erscheint es denkbar, daß die Plasmid-DNA gelegentlich im Verlauf des Transformationsexperimentes strukturell verändert (deletiert?) und dabei das *FAS2*-Gen defekt wurde. Sicherlich ebenfalls mit ihrer z.T. recht

unterschiedlichen Plasmid-Größe läßt sich die uneinheitliche Transformations-Effizienz der verschiedenen, in dieser Arbeit untersuchten *FAS2*-DNA Klone erklären. Es ist bekannt, daß kleinere Plasmide leichter in die Zelle eindringen und in ihr stabiler sind als größere (53). Weiterhin kann bei einer durch Rekombinations-Vorgänge bedingten Transformation die hohe Kopienzahl eines Plasmides in der Zelle u.U. auch eine erhöhte Transformations-Effizienz bewirken. Schließlich konnte, wie bereits vorher schon bei *FAS1* (L. Roberts, unveröffentlichte Ergebnisse), auch für *FAS2* bestätigt werden, daß die Orientierung eines klonierten Gens innerhalb des Plasmides für dessen Transformations-Eigenschaften nicht von Bedeutung ist.

Mit Hilfe der erwähnten Transformationsversuche konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die drei katalytischen *FAS2*-Domänen - 1.Reduktion, Kondensation und Acyl-Carrier-Protein - innerhalb definierter, räumlich gegeneinander abgrenzbarer DNA-Bereiche im *FAS2*-Gen lokalisiert sind. Obwohl eine entsprechende Genorganisation auch bei *FAS1* (10) und allen anderen bisher klonierten multifunktionellen Genen (54, 55) gefunden wurde, war eine solche nicht unbedingt von vorneherein als selbstverständlich vorauszusetzen, da funktionelle Zentren innerhalb eines Enzymproteins grundsätzlich auch durch Rückfaltung der Proteinkette und Zusammenlagerung weit auseinanderliegender Bereiche derselben entstehen könnten. In diesem Fall wäre die Definition einer katalytischen 'Domäne' nur auf Protein-, nicht aber auf DNA-Ebene gerechtfertigt.

Im Gegensatz zur Organisation des *FAS1*-Gens der Hefe (10), wo

zwischen den Dehydratase- und den Enoylreduktase-Domänen ebenso wie zwischen den Enoylreduktase- und den Acetyltransferase-Domänen größere DNA-Bereiche gefunden wurden, in welchen Mutationen offensichtlich keine phänotypischen Auswirkungen auf die Enzymfunktion haben, wurden zwischen den drei *FAS2*-Domänen keine größeren, funktionell undefinierten Interdomänen-Regionen nachgewiesen. Alle bisher vorliegenden Daten sind demnach mit der Vorstellung vereinbar, daß die Hefe-Fettsäuresynthetase durch Fusion ursprünglich monofunktioneller Einzelenzyme im Laufe der Evolution als multifunktionelles Enzymprotein entstanden ist (56).

Es erscheint vom Reaktionsmechanismus her sinnvoll, daß Acyl-Carrier-Protein und ß-Ketoacylsynthase zueinander benachbart sind. Somit kann zum Start eines Zyklus die Acyl-Gruppe vom ACP direkt auf die -SH-Gruppe der neben ihm liegenden Synthase übertragen werden. Demgegenüber war zunächst überraschend, daß die ACP-Domäne am Ende und nicht in der Mitte, sozusagen als "Mittler" zwischen der ß-Ketoacylreduktase-Region und der Synthase-Region liegt. Dieser Befund steht jedoch mit einem hier im Institut entwickelten Modell des Hefe-FAS Komplexes in Einklang, wonach die minimale funktionelle Untereinheit der Hefe-FAS ein $\alpha_2\beta_2$ Dimeres ist. Dabei haben die beiden identischen Untereinheiten im Komplex eine antiparallele Kopf-Schwanz Anordnung. Diese Anordnung erlaubt - an Stelle des i n t r a molekularen - einen i n t e r molekularen Reaktionsmechanismus zwischen Kondensation und 1.Reduktion, wobei das Acyl-Carrier-Protein als "Schwingarm" zwischen den antiparallel angeordneten Untereinheiten fungieren und so die Reaktion zwischen der ß-Ketoacylsynthase und der ß-Ketoacylreduktase vermitteln kann (3).

Die Arbeitsgruppe von S. Wakil in Houston hat versucht, die Reihenfolge der verschiedenen FAS-Domänen in tierischer Fettsäuresynthetase (Huhn) durch kontrollierte Spaltung des Enzyms mit bestimmten Proteasen zu ermitteln (57). Die veröffentlichten Daten deuten darauf hin, daß in der Hühner-Fettsäuresynthetase die ß-Ketoacylsynthase und das Acyl-Carrier-Protein nicht, wie in Hefe, nebeneinander lokalisiert, sondern durch 5 Domänen (Acetyltransferase, Malonyltransferase, Enoyl-Reduktase, Dehydratase und ß-Ketoacylreduktase) räumlich voneinander getrennt sind. Wakil et al. (58) schlagen vor, daß - ähnlich wie wir dies im Hefe-Komplex postulierten - die Schwierigkeit der Wechselwirkung zwischen zwei in derselben Kette weit auseinander liegenden Reaktionszentren dadurch umgangen wird, daß sich die beiden α" Untereinheiten auch hier in Kopf-Schwanz Anordnung nebeneinander lagern und dadurch die beiden intramolekular entfernten Domänen intermolekular nahe zueinander zu liegen kommen. Wie aus einem Vergleich der relativen Anordnung der verschiedenen funktionellen Domänen in Hefe-FAS und im tierischen Enzym hervorgeht, läßt sich die Entstehung der einzigen Untereinheit des tierischen Fettsäuresynthetase-Komplexes nicht durch einfache Fusion der beiden Hefe-FAS Gene miteinander erklären. Geht man bei der Entstehung multifunktioneller Proteinketten von der Fusion ursprünglich molekular unabhängiger Einzelenzyme aus, so müßte man im vorliegenden Fall entweder zusätzlich zur einfachen Genfusion noch eine nachträgliche DNA-Umorganisation annehmen, oder man geht davon aus, daß beide "Cluster"-Gene unabhängig voneinander sich aus dem dissoziierten, prokaryontischen System entwickelt haben.

Von der Wakil'schen Arbeitsgruppe sowie von J. Carbon et al. wurden, unabhängig von unserem Institut, ebenfalls zwei *FAS2*-Klone, YEpFAS2 bzw. 10285, isoliert und charakterisiert (60). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen *FAS2*-Klonen enthalten diese Klone jedoch nicht das ganze *FAS2*-Gen, sondern nur jeweils einen Teil davon. Wie aus Abb.25 hervorgeht, ist in dem Plasmid YEpFAS2 bis auf ein kleines Stück am "rechten" Ende der klonierten Hefe-DNA fast das gesamte *FAS2*-Gen enthalten. Demgegenüber fehlen der klonierten Hefe-DNA des Plasmides 10285 der "linke" Teil des *FAS2*-Gens, während sie das "rechte" Ende des Gens beinhaltet (vgl. Abb.25) Die Restriktionskarten dieser beiden Klone stimmen im Bereich des Gens mit der am hiesigen Institut ermittelten (41) überein.

Vor kurzem wurde in unserem Labor mit der Sequenzierung des *FAS2*-Gens begonnen. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Transkriptionsrichtung von *FAS2* in der in Abb.23 enthaltenen Darstellung von "links" nach "rechts" verläuft. Ein potentielles Startcodon befindet sich innerhalb des in der vorliegenden Arbeit in den Vektor M13 mp18 eingebauten *PvuII*-Fragmentes (vgl. Abb.14) (J. Rösch, G. Müller, M. Schweizer, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieser Befund stimmt gut mit unseren, durch Transformation ermittelten Daten (vgl. Abb.23) überein, wonach das *FAS2*-Gen innerhalb dieses *PvuII*-Fragmentes entweder beginnt oder endet.

Die Verfügbarkeit beider *FAS*-Gene der Hefe frei von größeren Mengen unspezifisch flankierender DNA erlaubt es jetzt, *FAS1*-

und *FAS2*-DNA in ein und demselben Plasmid miteinander zu koppeln bzw. zu fusionieren. Mit solchen Plasmiden könnten dann eine Reihe interessanter Untersuchungen zur Regulation der Fettsäuresynthetase-Produktion in der Hefezelle gemacht werden. So ist zum Beispiel noch nicht bekannt, ob die Synthese der α- und der ß-Untereinheit des Hefe-FAS-Komplexes unkoordiniert ist oder einer gemeinsamen Kontrolle unterliegen. Immunologische Versuche mit nicht-komplementierenden *fas1*- und *fas2*-Mutanten hatten gezeigt, daß bei einem Ausfall der Synthese von einer der beiden FAS-Untereinheiten jeweils auch die andere FAS-Komponente in den Mutantenzellen nicht mehr enthalten ist (61). Dies könnte auf die oben erwähnte koordinierte Expression beider FAS-Gene in Hefe hindeuten. Andere, möglicherweise einfachere, Erklärungen des geschilderten Ergebnisses sind allerdings auch möglich. So wäre es beispielsweise denkbar, daß Proteasen die defekten Genprodukte bestimmter *fas*-Mutationen erkennen und abbauen. Schließlich könnten mit Hilfe eines *in vitro* konstruierten *FAS1*/*FAS2*-Fusionsgens bzw. dessen Genproduktes interessante Fragen zur Struktur und zum Mechanismus der Fettsäure-Biosynthese im Enzymkomplex der Hefe bzw. in FAS-Komplexen allgemein untersucht werden.

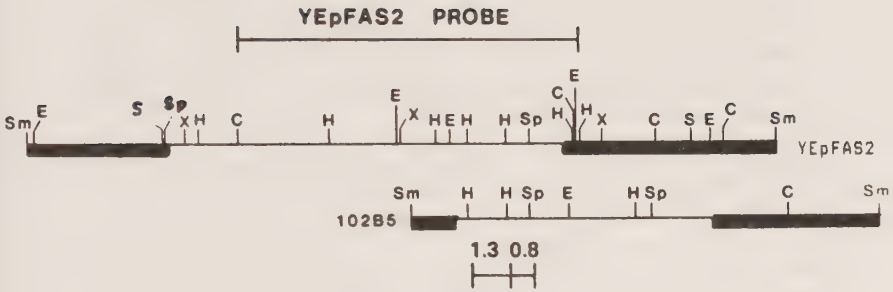


Abb.25: Restriktionskarte der Klone YEpFAS2 (Herkunft S. Wakil) und 102B5 (Herkunft J. Carbon)

Es ist die Lage der Restriktionsschnittstellen *SmaI* (Sm), *EcoRI* (E), *SalI* (S), *SphI* (Sp), *ClaI* (C), *HindIII* (H) und *XbaI* (X) angegeben.
Die dicken Linien stellen Vektor-DNA (YEp13 bei YEpFAS2 bzw. ColE1 bei 102B5).
Die Größe eines *HindIII* und eines *HindIII/SphI* Fragmentes ist angegeben.
Vgl. Abb.2.
Die Zeichnung ist (60) entnommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es gewesen, das *FAS2*-Gen der Hefe *S. cerevisiae* zu subklonieren und mit Hilfe der subklonierten Teilbereiche die Domänen-Reihenfolge innerhalb des trifunktionellen *FAS2*-Gens zu bestimmen. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Es wurden zwei neue Hefe/*E.coli* "shuttle"-Vektoren - pMS 202 und pMS 203 - konstruiert, die gegenüber dem Ausgangsplasmid pMS 201 nur noch jeweils eine der beiden *EcoRI*-Schnittstelle besitzen und somit für die Klonierung von *EcoRI*-Restriktionsfragmenten zu verwenden waren.

2. Aus dem Klon pMS 2583, der das intakte *FAS2*-Gen kloniert enthält, wurden 6 verschiedene *EcoRI*-Fragmente in dem Vektor pMS 202 subkloniert, davon 5 in beiden Orientierungen. Weiterhin wurden in den Vektor pMS 201 4 verschiedene *PvuII*-Fragmente aus pMS 2583 eingebaut, davon 2 in beiden Orientierungen. Insgesamt wurden somit 10 verschiedene *FAS2*-Fragmente mit Größen zwischen 1.66 und 12.5 kb subkloniert.

3. Aus zwei der unter (2) genannten *FAS2*-Subklonen wurde das darin enthaltene *FAS2*-Fragment in die M13-Vektoren mp11 bzw. mp18 umkloniert.

4. Die *FAS2*-DNA Insertion des Plasmides pMS 3276 wurde mit *Bal31*-Exonuklease sukzessive verkürzt und so eine Serie von 11, jeweils um 0.2 bis 1.2 kb verkürzten *FAS2*-Klonen konstruiert.

5. Einer der unter (4) entstandenen Klone (pMS 3291) wurde mit der Exonuklease *Bal31* weiter abgebaut und so 9 sukzessive verkürzte *FAS2* DNA-Fragmente kloniert, die sich mit den unter (4) genannten Klonen zum Teil überlappten.

6. Es wurden 23 verschieden *trp1/fas2*-Doppelmutanten, welche insgesamt die vier wichtigsten *FAS2*-Komplementationsgruppen repräsentierten, mit den unter (2), (4) und (5) konstruierten *FAS2*-Subklonen transformiert. Jedes der transformierenden Plasmide enthielt einen aus der Restriktionskarte bekannten, definierten Teilbereich des *FAS2*-Gens. Die Auswertung der Transformantionsdaten erlaubte eine Zuordnung der 3 katalytischen *FAS2*-Domänen zu definierten, räumlich gegeneinander abgrenzbaren DNA-Bereichen des *FAS2*-Lokus. Demnach ist die Reihenfolge innerhalb des Gens: ß-Ketoacylreduktase, ß-Ketoacylsynthase und Acyl-Carrier-Protein. Es zeigte sich, daß pleiotrope *fas2*-Mutanten über den ganzen Genort verstreut vorkommen.

7. In den transformierten Zellen wurde die *FAS2/TRP1*-Cotransformationsrate ebenso wie die mitotische Stabilität der Transformanten (bzgl. *TRP1* und *FAS2*) bestimmt. Mit Hilfe dieser Daten konnten Aussagen über den Transformationsmechanismus (Komplementation bei großen, das ganze

FAS2-Gen tragenden Plasmiden bzw. Rekombination bei kleineren) und über die Abmessungen des *FAS2*-Gens gemacht werden.

8. In Form des Plasmides pMS 3371 wurde ein *FAS2*-Klon hergestellt, der deutlich bessere Transformationseigenschaften als alle bisher verfügbaren *FAS2*-Klone besitzt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Volpe J.J. und Vagelos P.R. (1973), Ann. Rev. Biochem. 42, 21-60
2. Bloch K. und Vance D. (1977), Ann. Rev. Biochem. 46, 263-298
3. Schweizer E. (1984) in: Fatty Acid Metabolism and Its Regulation, Numa S. (Ed.), Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam, 59-83
4. Majerus P.W., Alberts A.W., Vagelos P.R. (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 1231-1238
5. Shimakata T. und Stumpf P.K. (1982), Arch. Biochem. Biophys. 217, 144-154
6. Stoops J.K., Arslanian M.J., Oh Y.H., Aune K.C., Vanaman T.C., Wakil S.J. (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1940-1944
7. Lynen F. (1969), Methods Enzymol. 14, 17-39
8. Schweizer E., Kniep B., Castorph H., Holzner U. (1973), Eur. J. Biochem. 39, 353-362
9. Schweizer M., Lebert C., Höltke H.J., Roberts L.M., Schweizer E. (1984), Mol. Gen. Genet. 194, 457-465
10. Höllerer E. (1985), Bestimmung der Domänenreihenfolge im pentafunktionellen *FAS1*-Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch Transformationsversuche mit klonierter *FAS1*-DNA, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg
11. O'Farrell P.H., Kutter E. und Nakanishi M. (1980), Mol. Gen. Genet. 179, 421-435

12. Produktinformation Bethesda Research Laboratories (BRL), Neu-Isenburg (1984)

13. Kushner S.R. und Vapnek D. (1980), Media and Methods for Bacterial Genetics, Laboratory Manual, University of Georgia, Athens

14. Messing J. (1983), Methods Enzymol. 101, 20-78

15. Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J. (1985), Gene 33, 103-119

16. Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B., Hofschneider P.H. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3642-3646

17. Bolivar F., Rodriguez R.L., Betlach M., Boyer H.W. (1977), Gene 2, 75-93

18. Boyer H.W. und Roulland-Dussoix D. (1969), J. Mol. Biol. 41, 459

19. Kühn L., Castorph H. und Schweizer E. (1972), Eur. J. Biochem. 24, 492-497

20. Shapiro M., Polisky B. (1979), Methods Enzymol. 68, 503-513

21. Birnboim H.C. und Doly J. (1979), Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523

22. Clewell D.B. (1972), J. Bacteriol. 110, 667-676

23. Meagher R.B., Tait R.C., Betlach M.C., Boyer H.W. (1977), Cell 10, 521

24. Messing J., Crea R. und Seeburg P.H. (1981), Nucl. Acids Res. 9, 309-321

25. Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J. (1982), in: Molecular Cloning, a Laboratory Handbook; Cold Spring Harbor Laboratory, New York

26. Schleif R.F. und Wensink C. (1981), in: Practical Methods in Molekular Biology, Springer-Verlag, 186-187

27. Schweizer M. (1978), Versuche zur Kartierung von ribosomalen RNS-Genen und des Fettsäuresynthetase-Lokus *fas2* in Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe aneuploider Stämme, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

28. Rickwood D. und Hames B.D. (1982), in: Gelelektrophoresis of Nucleic Acids, IRL-Press, Oxford/Washington, 47

29. Tautz D. und Renz M. (1983), Anal. Biochem. 132, 14-19

30. Vogelstein B. und Gillespie D. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 615-619

31. Produktinformation, American Flint Glass Corp., New York und Ref. 42

32. Produktinformation Boehringer, Mannheim (1984)

33. Chaconas G. und v.d. Sande J.H. (1980), Methods Enzymol. 65, 75

34. Simsek M. (1973), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1041

35. Pheiffer B.H. und Zimmerman S.B. (1983), Nucl. Acids Res. 22, 7853-7874

36. Fuller F. (1982), Gene 19, 43-54

37. Sanger F., Coulson A.R., Barrell B.G., Smith A.J.H., Roe B.A. (1980), J. Mol. Biol. 143, 161-178

38. Beggs J.D. (1978), Nature 275, 104-109

39. M. Schweizer, persönliche Mitteilung

40. Höltke H.J. (1984), Untersuchungen zur Struktur des FAS1-Gens der Hefe, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

41. Laux T. (1984), Restriktionskartierung des FAS2-Gens der Hefe und Versuche zur Isolierung der FAS-Gene aus Vertebraten, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg

42. Hohn B. und Collins J. (1980), Gene 11, 291-298

43. Messing J. (1983), Methods Enzymol. 101, 20-78

44. Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467

45. Messing J. und Vieira J. (1982), Gene 19, 269-276

46. Zauner I. (1985), Systematische Subklonierung von *FAS1* und *FAS2* DNA der Hefe *S.cerevisiae* in Sequenzierungs-konforme Derivate des Phagen M13, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg

47. Rösch J. (1986), Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg

48. Kühn L. (1972), Genetische und biochemische Charakterisierung von Fettsäuresynthetase-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

49. Seidler L. (1983), Feinkartierung der *FAS1*-Region im Genom von *S.cerevisiae* mit Hilfe spezieller Mutanten-Stämme und Subklonierung, Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg

50. Struhl K., Stinchcomb D.T., Scherer S., Davis R.W. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039

51. Orr-Weaver T.L., Szostak J.W., Rothstein R.J. (1983), in Wu R., Grossmann L., Moldave K., Methods Enzymol. 101, 228-245

52. Jackson J.A., Fink G.R. (1981), Nature 292, 306-311

53. Ilgen C.,Farabaugh J., Hinnen A., Walsh J.M., Fink G.R. (1980), in: Setlow J.K. und Hollaender A. (Eds.), Genetic Engineering, Elsevier, Plenum Press, New York 2, 169

54. Donahue T.F., Farabaugh P.J. und Fink G.R. (1982), Gene 18, 47-59

55. Zalkin H. und Yanofski C. (1982), J. Biol. Chem. 257, 1491-1500

56. Jones E.W. und Fink G.R. (1982) in: The Molekular Biology of the Yeast Saccharomyces (Metabolism and Gene Expression), Cold Spring Harbor Laboratory, 181-299

57. Mattick J.S., Tsukamoto Y., Nickless J. und Wakil S.J. (1983), J. Biol. Chem. 258, 15291-15299

58. Tsukamoto Y., Wong H., Mattick J.S. und Wakil S.J. (1983), J. Biol. Chem. 258, 15312-15322

59. Lebert C. (1985), Klonierung der Fettsäuresynthetase-Gene *FAS1* und *FAS2* aus *Saccharomyces cerevisiae* und Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung des *FAS1* Gens, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

60. Kuziora M.A., Chalmers J.H., Douglas M.G., Hitzeman R.A., Mattick J.S., Wakil S.J. (1983), J. Biol. Chem. 258, 11648-11653

61. Schuh B. (1985), Molekulare Grundlagen von Veränderungen des Fettsäuresynthetase-Gehaltes in Wildtyp- und *fas* Mutanten-Zellen der Hefe, Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
ARS	autonom replizierende Sequenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Etbr	Ethidiumbromid
FAS	Fettsäuresynthetase
FAS	Gen der Fettsäuresynthetase
fas	Fettsäure-auxotrophe Mutanten
h	Stunde(n)
KE	Klett-Einheit(en)
kb	Kilobasenpaar(e)
min	Minute(n)
mRNA	messenger-RNA
Nr.	Nummer
o.	oben
PEG	Polyäthylenglykol

RE	Restriktionsendonuklease
Reg.rate	Regenerationsrate
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
T	Tryptophan
Tab.	Tabelle
Tc	Tetracyclin
TRP1	Gen der Phosphoribosyl-Anthranilat Isomerase in Hefe
u.	unten
U	Einheit der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
#	Nummer

LEBENSLAUF

Ursula Hoja

geb. Wittmann am 22. August 1957 in Pappenheim

Eltern: Franz Wittmann, Rektor

Hildegard Wittmann, geb. Meyer, Hausfrau

röm.-katholisch

verheiratet

September 1963 - März 1966	Grundschule Pappenheim
März 1966 - Juli 1967	Pestalozzi-Grundschule Erlangen
September 1967 - Juni 1976	Gymnasium Fridericianum Erlangen
Mai 1976	Abitur
November 1976 - April 1981	Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Mai 1981	Diplom-Hauptprüfung
Juli 1981 - Oktober 1982	Anfertigung der Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer mit dem Thema: "Untersuchungen zur Biosynthese der mitochondriellen Atmungskette in Hefe mit Hilfe atmungsdefekter Mutanten"
seit November 1982	Anfertigung der Doktorarbeit am Lehrstuhl für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. E. Schweizer

Herstellung: Copy Center 2000 Obere Karlstraße 30 8520 Erlangen